

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences
de l'Université de Lyon

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Christian COSTA

Ingénieur Biochimiste I. N. S. A.

PREMIÈRE THÈSE

Etude de l'influence de différents facteurs
sur la croissance de *Trichoderma viride*
et son activité cellulolytique

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la faculté

Soutenues le Septembre 1966 devant la Commission d'Examen :

M.	J. CHOPIN, Président	
Mlle	D. GAUTHERON	} Membres du Jury
MM.	H. PACHÉCO	
	F. STOEGER	

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences
de l'Université de Lyon

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Christian COSTA

Ingénieur Biochimiste I. N. S. A.

PREMIÈRE THÈSE

Etude de l'influence de différents facteurs
sur la croissance de *Trichoderma viride*
et son activité cellulolytique

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la faculté

Soutenues le 9 Septembre 1966 devant la Commission d'Examen :

M.	J. CHOPIN, Président	
Mlle	D. GAUTHERON	} Membres du Jury
MM.	H. PACHÉCO	
	F. STOEBER	



UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES.

Doyens honoraires.

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD,
EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET.

Doyen.

M. BRACONNIER

Assesseurs.

MM. MESNARD
BOIDIN

Professeurs.

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie Industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie générale II
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique Industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie Biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHNER	Chimie Industrielle
PAVANS de CECCATTY	Zoologie

MM.	MERLIN	Chimie analytique
	DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
	PHILBERT	Physique nucléaire
	COHEN-ADAD	Chimie
	DAVID Louis	Géologie générale
	CHANEL	Psychophysiologie
	MAURY	Méthodes Mathématiques de la Physique
	DEPRAZ	Physique nucléaire
	GAUTHIER Jean	Chimie
	GAUME	Physique expérimentale
	UZAN	Physique S.P.C.N.
	LEGAY	Biologie animale.

Professeurs sans chaire.

MM.	FERON	Mathématiques
	LAFORGUE	Physique
	CHENEVOY	Géologie appliquée
	GINET	Zoologie
	ASCH	Physique
	MICHEL Pierre	Minéralogie
Mle.	MAITROT	Physique
	GEVIN	Géologie générale
	PONASSE	Mathématiques
	d'INCAN	Physique C.S.U.
	LEFEBVRE	Mathématiques
	PERNET	Mathématiques
	CHERY	Physique
	BERGEON	Physique C.S.U.
Mle	GAUTHERON	Chimie biologique
	DESCOTES	Chimie organique
	ERBEIA	Physique
Mme	ERICSON	Physique générale
	LEMOIGNE	Botanique
	MARTEL	Mécanique
	MATHIEU	Mécanique des fluides
	MICHEL Georges	Biochimie

Maîtres de Conférences

MM.	PICARD Philippe	Mathématiques
	DEMARCO	Géologie générale
	LEBRETON	Biologie végétale
	DAVID Jean	Biologie animale
	TOUSSET	Chimie propédeutique
	FEUVRAIS	Physique Electricité
	SCHMITT	Physique C.P.E.M.

MM.	LAURENT	Chimie organique
	RCT	Mathématiques
	BETHOUX	Mathématiques T.M.P.
Mle	CALAIS	Mathématiques
	GUSAKOW	Physique
Mle	THOMAS	Chimie minérale
	COLOBERT	Physiologie
	AUBIN	Analyse numérique
	BUCHWALTER	Mathématiques
	BOUZON	Mathématiques C.S.U.
	COSNIER	Psychophysiologie
Mle	LAMOURE	Biologie végétale
	PORTHAULT	Chimie C.S.U.
	VALLET	Chimie macromoléculaire

Maître de Conférences adjoint

M.	PIERRON	Chimie
----	---------	--------

Conseiller administratif

M.	BURNET
----	--------

Secrétaire Principal Honoraire

M.	ROUX.
----	-------



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553403_0016

A MONSIEUR HENRI PACHECO

Professeur à la Faculté des Sciences de LYON

Chef du Service de Chimie Biologique

à l'Institut National des Sciences Appliquées.

En témoignage de profonde et respectueuse reconnaissance

A MES PARENTS

A MA FEMME ET A SES PARENTS

A TOUTE MA FAMILLE ET BELLE-FAMILLE

En hommage de ma profonde affection.

AVANT - PROPOS

=====

Le présent travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Institut National des Sciences Appliquées sous la direction de Monsieur le Professeur H. PACHECO.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre profonde gratitude pour les conseils qu'il nous a prodigués et l'aide morale qu'il nous a apportée.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur J. CHOPIN qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que Mademoiselle et Monsieur les Professeurs D. GAUTHERON et F. STOEBER, qui ont bien voulu juger notre thèse.

Nous remercions très cordialement la société S.A.R.B. de DECINES qui, par son appui matériel, a permis de mener à bien ce travail, et nous sommes heureux d'exprimer notre gratitude à son Directeur Monsieur P. GAUTIER, et à Monsieur J. KOENIG, Directeur du Service de Recherches.

Que tous nos camarades de laboratoire soient assurés de notre sincère amitié.

BUT DE NOTRE TRAVAIL

La récupération et l'utilisation des déchets celluloseux, très abondants en agriculture, sont des problèmes majeurs. On peut envisager de convertir la cellulose, principal constituant de ces déchets, en substances assimilables telles que le glucose, de deux manières différentes :

- une hydrolyse acide,
- une dégradation biologique par les microorganismes tels que les champignons imparfaits ou les bactéries cellulolytiques, ou une hydrolyse enzymatique.

La première méthode exige une grande dépense d'énergie et pose des problèmes techniques délicats. La seconde, plus élégante, a l'avantage d'être peu coûteuse et permet, d'autre part, la récupération du microorganisme qui peut présenter une valeur nutritive.

Notre étude était primitivement orientée vers le domaine appliqué : cultiver un champignon sur des déchets celluloseux, tels que les rafles de maïs, sans traitement préalable, afin :

- de récolter en un minimum de temps le maximum de mycelium, celui-ci pouvant en effet, par son contenu azoté, ses vitamines et autres composants, présenter une valeur nutritive pour les animaux.

- de recueillir les cellulases libérées dans le milieu de culture par le microorganisme, soit pour les incorporer à l'alimentation animale et faciliter la digestion, soit pour attaquer à nouveau un substrat cellulosique en produisant des sucres réducteurs en solution, principalement du glucose. Ce milieu, enrichi en glucose, peut servir à cultiver d'autres microorganismes, levures ou bactéries, susceptibles d'un développement rapide et de constituer une matière nutritive.

Mais, a priori, on ignorait si les rafles de maïs convenaient à la pousse du champignon, et dans le cas favorable, si elles stimulaient ou freinaient la croissance. C'est pourquoi une mise au point préalable sur une cellulose de référence, a été réalisée dans une étude systématique de l'influence de divers facteurs sur :

- la dégradation de la cellulose pure SOLKA FLOC par Trichoderma viride,
- la croissance du mycelium,
- la production des cellulases.

Les résultats obtenus nous ont permis de faire des observations intéressantes sur le milieu de référence utilisé, la consommation des ions ammonium, les variations du pH pendant la croissance du microorganisme et, par suite, d'apporter des améliorations :

- accroissement de la production du mycelium,
- accroissement de la production des cellulases et du pouvoir cellulolytique des filtrats de culture,
- diminution du temps d'incubation nécessaire à ces productions.

L'étude comparée des cultures effectuées sur cellulose de référence et sur rafles de maïs, a montré des différences essentielles, dans le comportement du champignon et des cellulases qu'il libère, vis-a-vis de ces deux substrats, en faveur des rafles de maïs.

- I N T R O D U C T I O N -

I - IMPORTANCE DE LA CELLULOSE ET DE SA DEGRADATION DANS LA NATURE

La cellulose est la substance organique la plus abondante de la nature puisqu'elle est le constituant majeur de la plupart des végétaux. Ainsi, le bois en contient 40 à 50%, tandis que le coton en est composé de 91%. C'est pourquoi elle a été utilisée à des fins variées telles que la fabrication du papier, des textiles, explosifs, cordages, revêtements, bois de construction, et dans l'industrie alimentaire.

Mais l'homme n'est pas seul à utiliser la cellulose. En effet, celle-ci est un polyholoside qui peut constituer une substance nutritive pour divers organismes, dont une liste importante est décrite par J.A. & M.M. GASCOIGNE (14) et dans laquelle sont cités des invertébrés, des insectes, des végétaux, des champignons supérieurs et surtout, des organismes microscopiques tels que les champignons imparfaits (moisissures) et les bactéries. Les ruminants assimilent une partie de la cellulose grâce à la présence de bactéries dans le rumen.

La dégradation biologique de la cellulose est nécessaire car elle joue un rôle primordial dans le cycle du carbone. RABINOWITCH (55) a calculé que si le mécanisme de cette dégradation était bloqué, alors que la photosynthèse se poursuivait, toute vie cesserait sur terre dans les vingt ans qui suivent.

Cependant, malgré cette nécessité, l'attaque de la cellulose par les microorganismes n'est pas moins parfois gênante.

En effet, non seulement ceux-ci attaquent la cellulose native, comme le coton et le bois vert, mais encore envahissent les produits cellulosiques utilisés par l'homme. En 1924, aux U.S.A. la perte annuelle due à la pourriture du bois s'élevait à quatre cent millions de dollars (29). Même de nos jours, les méthodes utilisées pour préserver les matériaux cellulosiques, sont purement empiriques. C'est pourquoi les chercheurs essaient de reproduire in vitro la dégradation naturelle afin d'en mieux connaître les mécanismes, de rechercher les conditions favorables de culture et d'extraire les enzymes responsables de la cellulolyse : les cellulases.

II - HISTORIQUE :

Jusqu'en 1951, la dégradation de la cellulose n'avait pas fait l'objet d'études approfondies. HOPPE-SEYLER (28) en 1883, fut probablement le premier à rapporter la pourriture de la cellulose par les animaux et les plantes, tandis que de BARY (3) notait, trois ans après, que la moisissure Periza sclerotium sécrétait des enzymes qui dissolvaient la cellulose. Deux ans plus tard, MARSHALL-WARD (39) note que le tissu macéré de la moisissure Botrytis a une forte activité de décomposition envers la cellulose. Mais la première observation, sans équivoque sur l'action des cellulases in vitro, est celle de SEILLIERE en 1906 qui démontre une action lente du jus hépatopancréatique d'escargot sur la cellulose native et une action plus rapide sur la cellulose régénérée.

Mais les principaux organismes cellulolytiques sont surtout des bactéries et des moisissures.

III - TRAVAUX EFFECTUES DEPUIS CES DERNIERES ANNEES :

Ce n'est que depuis ces quinze dernières années que d'importants travaux sont poursuivis, surtout à l'étranger, en vue d'élucider le mécanisme de la cellulolyse. Cependant, malgré les efforts fournis en ce sens, le processus reste encore mal connu.

A/ Microorganismes cellulolytiques utilisés :

Les chercheurs ont à leur disposition une variété très étendue de microorganismes dont une partie est répertoriée dans l'ouvrage de J.A. & M.M. GASCOIGNE (14). Parmi ceux-ci, nous pouvons citer des moisissures très actives, telles que Eurothecium verrucaria, Trichoderma viride (= Trichoderma koningi), plusieurs penicillium et aspergillus, et certaines bactéries comme Clostridium thermocellulaseum, Sporocytophaga myxococcoïdes (= Cytophaga globulosa) ainsi que les microorganismes du rumen.

Ces études nécessitent la collaboration de chercheurs de diverses spécialités.

B/ Etendue des recherches :

1) La chimie de la cellulose permet de mieux connaître la structure et les propriétés du matériel de travail. Ainsi, différents facteurs affectant la cellulose peuvent influencer la cellulolyse :

a) l'humidité favorise la dégradation de la cellulose en gonflant les fibres, en créant un milieu de diffusion pour les enzymes, et en apportant les ions de l'eau lors de la coupure des liaisons osidiques.

b) le degré de cristallinité joue un rôle très important (48), (91), (92), (63). WALSETH (91) a montré que les enzymes dégradent d'abord les régions amorphes, plus accessibles du fait de leur taux d'humidité, l'attaque des régions cristallines n'intervenant qu'après gonflement.

c) de même la dimension de la cellule unité (27), la structure capillaire des fibres (74), (60), (31), la conformation stérique de la molécule et le degré de polymérisation (DP) (16) influent beaucoup sur sa dégradation biologique.

d) de plus, à la cellulose sont toujours associées des substances qui stimulent ou inhibent la croissance des microorganismes: outre les éléments minéraux présents dans la fibre et nécessaires au développement, les fibres peuvent contenir des vitamines (30) et de l'azote (13), (69) qui favorisent le développement des organismes cellulolytiques, ou des substances phénoliques telles que la lignine (52), qui inhibent les cellulases. Mais certaines souches de microorganismes sécrètent en un premier temps des ligninases, afin de pouvoir, en un second temps, attaquer la cellulose.

Mais si les microorganismes dégradent convenablement la cellulose native, en renouvelant constamment les cellulases qu'ils sécrètent, celle-ci présente une haute résistance à l'attaque des cellulases contenues dans les filtrats de cultures, libres de cellules vivantes (9). Ce fait a conduit les chercheurs à utiliser des celluloses régénérées, soit par gonflement à l'acide phosphorique (92), (93), soit par traitement aux alcalis, et des celluloses substituées, telles que la carboxyméthyl-cellulose (CMC) et la méthyl-cellulose, dont certaines sont solubles. La solubilisation de ces composés, qui dépend du degré de substitution (DS)*, est complète pour un DS compris entre 0,5 et 0,7. La susceptibilité du substrat envers l'enzyme croît en même temps que le DS, puis décroît à partir du point de solubilisation complète en même temps que le DS croît (59).

2) La microbiologie apporte les connaissances nécessaires à la recherche des microorganismes cellulolytiques et des méthodes de culture. Les diverses sources de cellulases, de même que les procédés et les milieux de cultures, ont été décrits dans l'ouvrage de J.A. & M.M. GASCOIGNE (14). Ces deux derniers points, bien que largement utilisés, ne donnent pas entière satisfaction; les divers facteurs de production étant assez mal définis. En effet, à chaque microorganisme correspondent des conditions de culture appropriées: pH, température, concentration et variété de la cellulose, concentrations relatives de certains ions. C'est pourquoi les milieux de culture décrits dans la littérature sont souvent empiriques.

* Nombre moyen de substituants par unité glucosyle.

Les principales recherches actuelles ont porté sur les microorganismes du groupe des champignons imparfaits (moisissures) tels que Myrothecium verrucaria et Trichoderma viride. Les facteurs de production d'enzymes à partir de bactéries ont fait l'objet d'une étude de J. RIVIERE (67). Toutes les étapes de la dégradation biologique et enzymatique de la cellulose peuvent être suivies dans certains ouvrages spécialisés (74), (53), (65).

3) Si les travaux sur la dégradation biologique de la cellulose se sont multipliés depuis ces quinze dernières années, c'est sans doute grâce à la biochimie qui est devenue une science particulière et spécialisée.

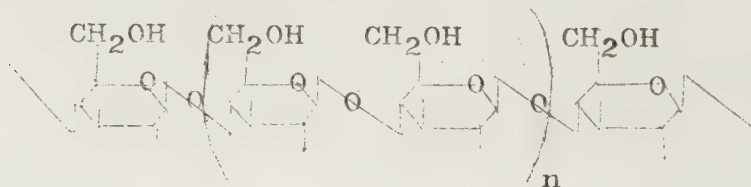
La microbiologie a permis d'obtenir des enzymes cellulolytiques sécrétés dans le milieu de culture par les microorganismes. C'est à la biochimie qu'appartient le rôle d'élucider les mécanismes d'action de ces substances.

C/Fractionnement - Purification et Caractérisation des cellulases :

La culture des microorganismes in vitro fournit aux chercheurs des filtrats contenant un grand nombre de substances, dont les cellulases. Il faut donc, au préalable, fractionner et purifier ces enzymes. Plusieurs méthodes ont été décrites ou énoncées dans les ouvrages de J.A. & M.M. GASCOIGNE (14), et E.T. REESE (65). Celles-ci diffèrent selon les souches de microorganismes utilisées et mettent en jeu les techniques les plus variées telles que le traitement par la chaleur (33), (1), la précipitation fractionnée (94), (95), (77), (87), l'électrophorèse (77), (22), (78), (88), l'électrophorèse de zone sur amidon (43), (44), (45), (46), (37), la chromatographie sur papier (61), la chromatographie sur colonne (16), (87), (22), (75).

Les enzymes purifiés sont soumis aux différents tests enzymologiques, permettant de les identifier aux cellulases ou β (1 $\rightarrow$ 4) glucosidases :

- plusieurs substrats de structure chimique différente, sont soumis aux extraits enzymatiques qui ne s'avèrent actifs que sur les composés β (1 $\rightarrow$ 4) glucanes possédant des liaisons β (1 $\rightarrow$ 4) glucosidiques, caractéristiques de la cellulose :



Cependant, certaines variations, dues en grande partie à la souche de microorganisme utilisée, sont à noter ; le degré de polymérisation y jouant notamment un grand rôle. Ainsi :

- la cellulase d'Aspergillus orizae hydrolyse le cellohexose et pas le cellotriose. La cellulase de Myrothecium verrucaria hydrolyse les hauts polymères et peu le cellobiose (1), (95). La cellulase de Stachybotrys atra hydrolyse le cellotriose ; pas le cellobiose (65).

D'autre part, le filtrat de culture de Trichoderma viride, hydrolyse la cellulose Solka Floc quatre fois plus vite que celui de Myrothecium verrucaria, qui est cependant plus actif sur les dérivés solubles de la cellulose (58).

L'origine du substrat est aussi un facteur de variation de l'activité enzymatique pour une cellulose donnée : SAUNDERS, SIU et GENEST (68) obtiennent 11% de conversion sur fibres de coton moulues, 28 % sur cellophane, 8% sur papier filtre moulu, à partir de cultures de Trichoderma viride.

Les études sur l'influence de la concentration en cellulose, du pH, de la température, de l'inhibition et de l'activation, montrent aussi des variations selon l'origine des cellulases.

D/Théories de la cellulolyse et mode d'action des cellulases :

Trois grands problèmes, dont un seul est actuellement résolu, dominent l'ensemble des recherches :

- Théorie oxydative ou hydrolytique de la dégradation de la cellulose,
- Multiplicité ou unicité enzymatique,
- Attaque de la cellulose en bout de chaînes ou au "hasard".

1) Théorie oxydative ou hydrolytique

Le problème était de savoir si l'attaque de la cellulose par les microorganismes, était une dégradation oxydative ou une hydrolyse.

Il y a une trentaine d'années, les chercheurs penchaient encore pour la première hypothèse : en effet, lorsqu'un champignon croît sur un milieu cellulosique, on remarque une acidification, qui était considérée comme une oxydation des groupements réducteurs de la cellulose en groupements carboxyles (12), (36). LOICJANSKAJA (35) par ailleurs, cultivant une bactérie, Cytophaga, sur papier filtre déterminait un

accroissement du taux d'acide uronique et de furfural soluble après l'attaque, tendant à démontrer l'hypothèse d'une dégradation oxydative. D'autres travaux révélaient des résultats semblables (99), (50), (90).

Mais plusieurs faits ont permis de rejeter cette théorie et d'adopter la théorie hydrolytique :

- dans le sol, les champignons cellulolytiques utilisent la cellulose comme seule source de carbone et aucune variation notable de pH n'a lieu.

- les produits majeurs de la dégradation sont le gaz carbonique et le mycelium (93). La présence d'acides dans le cas de bactéries anaérobies résulte d'une attaque secondaire.

- la cellulose étant composée de régions amorphes et cristallines, il est nécessaire qu'au moins un enzyme à plusieurs fonctions, sinon plusieurs enzymes, soit présent chez le microorganisme pour effectuer les transformations suivantes:

- hydrolyse des régions amorphes,
- gonflement des régions cristallines qui libèrent des chaînes linéaires qui réagissent comme les précédentes,
- production de cellobiose et dans certains cas de glucose,
- transglucosylation des di et oligosaccharides,
- rupture des liaisons irrégulières $\beta(1 \rightarrow 3)$

PRINGSHEIM (54) en 1912, suggéra que deux hydrolases (carbo-hydrases) étaient actives dans la cellulolyse : une cellulase et une cellobiase, libérant respectivement du cellobiose et du glucose. Cependant, l'identification du cellobiose laissait à désirer et il a fallu attendre vingt ans pour que ces résultats soient confirmés par WOODMAN et STUART (100) qui démontrèrent la présence de glucose après dégradation biologique de la cellulose, puis par SIMOLA (73) qui vérifia ces résultats par des mesures de pouvoir rotatoire, pouvoir réducteur, point de fusion mélangé des osazones et hydrolyse du cellobiose par l'émulsine qui est une β glucosidase. Les résultats peuvent être variables selon la teneur en oxygène dans la culture : VARTIOWAARA (89) montre ainsi l'accumulation d'une substance réductrice dans une culture de Sporotrychum carnis, peu aérée, alors que des substances non réductrices sont obtenues à partir d'une culture aérée. Ces dernières sont hydrolysées en sucres réducteurs par hydrolyse acide. Il est à remarquer que l'accumulation de glucose dans une culture tend à inhiber une dégradation ultérieure de la cellulose.

3) Attaque de la cellulose en bout de chaînes ou au "hasard" :

Certains auteurs, comme CLAYSON (6), et plus récemment NISIZAWA et KOBAYASHI (47) admettent une attaque de la cellulose au bout des chaînes moléculaires avec libération de cellobiose, tandis que WHITAKER (97), (98), travaillant sur des cellodextrines, conclut à une coupure "au hasard" le long de la chaîne. D'autres auteurs, comme K. SELBY, penchent pour une solution moyenne, les deux modes d'attaque ayant lieu simultanément.

D'autre part, le mode de coupure des molécules de cellulose est également sujet à controverses : selon A.S. PERLIN (51), certaines endoglucosanases ne sont pas spécifiques de la liaison $\beta(1 \rightarrow 4)$ mais du groupement réducteur libéré, ce qu'il a pu montrer en utilisant différents substrats possédant en particulier des liaisons $\beta(1 \rightarrow 3)$ et $\beta(1 \rightarrow 4)$ alternées.

Ainsi ces divers problèmes sont très controversés et restent encore mal connus.

IV - IMPORTANCE INDUSTRIELLE DES CELLULASES

Les recherches fondamentales que nous venons d'examiner, ont permis l'application de certains résultats à des domaines divers tels que la physiologie végétale, l'agronomie, la pharmacie et les industries de fermentation, d'alimentation, des textiles, du papier etc...

Nous pouvons distinguer deux aspects de la recherche appliquée sur la dégradation biologique de la cellulose :

- A) Préservation des matériaux cellulosiques,
- B) Utilisation en tant que source d'énergie.

A) Préservation des matériaux cellulosiques

Chaque année, des pertes importantes, dues aux micro-organismes cellulolytiques sont constatées, aussi bien sur la plante elle-même que sur les matériaux cellulosiques commerciaux, tels que le bois de construction, le papier ou les textiles. Pour lutter contre cette destruction, diverses méthodes sont utilisées :

- Modification de la molécule de cellulose :

Depuis la démonstration de DOREE (11), sur la résistance à la dégradation biologique de l'acétate de cellulose, des procédés semblables se sont très largement développés, tels que la cyanéthylation (7), la phosphorylation (74), la méthylation (57), (17), et la phosphonométhylation (25)

- Protection des matériaux par un revêtement inerte :

Cette méthode était déjà préconisée depuis une quarantaine d'années (26), (76), (2), (56). Les promoteurs d'un tel procédé enduisaient les matériaux cellulotiques d'une couche de cire, d'huile ou de gomme, afin d'en retarder l'attaque biologique. Plus récemment, CHANCE (5) a utilisé les résines synthétiques, telles que l'O-(hydroxy-méthyl)phénol-formaldéhyde.

Les peintures et les vernis ne peuvent être considérés comme protecteurs que s'ils contiennent des agents toxiques.

- Agents toxiques

J.A. & M.N. GASCOIGNE (14) et E.T. REESE (65) décrivent des listes très étendues de composés considérés comme inhibiteurs des cellulases. Mais le problème est complexe et le choix des inhibiteurs est empirique car il dépend du substrat et de l'état où il se trouve. Ainsi, pour la pâte à papier, ou le papier fini, la méthode sera différente.

B) Utilisation des cellulases comme sources d'énergie :

1) "Saccharification"* des déchets cellulotiques:

La fermentation des substances naturelles, dans le but d'obtenir des solutions sucrées, des solvants, des antibiotiques ou même certains gaz, est très répandue. Cependant, les déchets de bois se montent actuellement à cent soixante quatorze mille tonnes, en GRANDE BRETAGNE (40). D'autre part, un million de tonnes de paille et de cosses pourraient être saccharifiées annuellement (66). Les filatures et les fabriques de papier peuvent aussi fournir de tels substrats.

La saccharification par les acides exigeant une trop grande dépense d'énergie et posant des problèmes techniques, ne peut entrer en compétition avec la dégradation par les cellulases, comme l'ont montré REESE (58) et TOYAMA (86) à l'inverse de WALSETH (92). Cependant, plusieurs difficultés apparaissent :

- Lors de l'hydrolyse de la cellulose, le glucose libéré est un facteur limitant et freine une dégradation poussée. Par ailleurs, une grande partie du glucose libéré est consommée par le mycelium pour assurer ses besoins en Carbone.

- De plus, si la pulpe de patate non bouillie est décomposée à 75% par un filtrat de culture de Trichoderma viride (82), (83), les déchets, tels que la sciure et les cosses de riz, sont très peu dégradés. Aussi faut-il un traitement préalable aux acides et aux alcalis pour obtenir un taux de saccharification valable avec libération de 2 à 3% de glucose dans le milieu (85).

* Ce terme est impropre ; il est surtout utilisé dans l'industrie.

Comme l'attaque de la cellulose par les cellulases est peu significative, l'attaque directe par les microorganismes, se montrant beaucoup plus efficace, est envisagée.

Le mycelium récolté peut être utilisé comme complément dans la nourriture des poulets, tandis que les solutions sucrées provenant de la saccharification, servent de milieu de culture pour les levures (83), (85).

2) Dégradation des aliments crus (65) :

Les enzymes purifiés agissent sur toute sorte de plantes en détruisant les parois cellulaires, provoquant ainsi un ramollissement permettant :

- un accroissement du taux d'extraction de certaines substances, telles que les protéines, l'amidon, les médicaments, les huiles, les jus de fruits, et l'agar-agar à partir des algues.

- une mise en conserve des carottes, qui ont une forte valeur nutritive. Cette opération était pratiquement impossible auparavant.

- un épluchage enzymatique des oranges. Cette opération est effectuée en quatre heures dans un bain à 40°C par un extrait de culture de Trichoderma viride.

3) Les cellulases dans la digestion animale

L'inclusion de cellulases dans la nourriture des volailles et des souris, donne un accroissement marqué du poids et une meilleure utilisation de la cellulose, que chez les animaux de contrôle, (23), (41), (42).

D'autre part, les cellulases digèrent les parois des levures qui sont ensuite assimilées par les animaux.

L'utilisation chez l'animal est maintenant très répandue, de même que chez l'homme, où des médicaments contenant des cellulases sont administrés dans les cas d'insuffisance pancréatique.

PLAN DE TRAVAIL

CHAPITRE I

Méthodes d'évaluation de la croissance du mycelium sur cellulose SOLKA FLOC et sur rafles de maïs, de l'attaque du substrat cellulosique et de l'activité cellulolytique des filtrats de cultures.

CHAPITRE II

Influence de l'aération et de l'agitation sur la production du mycelium et des cellulases.

CHAPITRE III

Influence du substrat de culture sur la production de mycelium et des cellulases.

CHAPITRE IV

Influence de la préculture sur la production de mycelium et des cellulases.

CHAPITRE V

Influence des ions minéraux et du pH sur la production du mycelium et des cellulases.

CHAPITRE VI

Modifications apportées à la composition ionique et au pH du milieu de culture, et influence sur la croissance du mycelium et sur la production de cellulase.

C H A P I T R E I

METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE DU MYCELIUM,
DE LA DEGRADATION DU SUBSTRAT CELLULOSIQUE ET
DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DES FILTRATS DE CULTURE.

o

o

o

INTRODUCTION

Les nombreux travaux effectués sur la dégradation biologique de la cellulose nous ont permis de sélectionner divers éléments nécessaires à la réalisation de notre étude : microorganisme, substrat cellulosique, milieu minéral de référence.

I - SOUCHE DE MICROORGANISME CHOISIE :

Parmi les nombreux organismes cellulolytiques étudiés dans la littérature, il semble que Trichoderma viride qui fait l'objet de recherches très étendues, soit le plus actif. En effet, selon REESE (58), le filtrat de culture de ce champignon hydrolyse la cellulose SOLKA FLOC quatre fois plus vite que celui de Myrothecium verrucaria ; et selon TOYAMA (79), Trichoderma viride a l'activité cellulolytique la plus élevée parmi plusieurs espèces de moisissures étudiées. C'est pourquoi nous avons choisi ce microorganisme comme agent de dégradation de la cellulose.

Trichoderma viride appartient à la classe des hyphomycètes, de l'ordre des champignons imparfaits (= adelomycètes ≡ deutéromycètes). La souche de Trichoderma viride 8678 (Pers. ex. Fr.) nous a été fournie par le "Centralbureau Voor Schimmelcultures", (CBS), Baarn, HOLLANDE.

Afin de limiter la sporulation du champignon, celui-ci est conservé en grande partie sous forme de filaments, grâce à des repiquages mensuels sur des tubes de gélose glucosée SABOURAUD.

II - SUBSTRATS CELLULOSIQUES UTILISES

Notre but étant avant tout d'intérêt industriel, notre choix s'est porté sur les déchets cellulosiques courants, parmi lesquels nous avons utilisé les rafles de maïs qui sont habituellement brûlées ou enterrées après égrenage des épis. Mais une telle étude sur un substrat naturel ne peut être envisagée sans un travail parallèle sur une cellulose de référence, de composition chimique déterminée, afin de comparer les résultats obtenus et savoir si ce substrat naturel stimule ou inhibe le développement du microorganisme.

A/ Cellulose de référence :

De nombreux auteurs ont utilisé des celluloses modifiées, telles que les alcali-celluloses ou les celluloses gonflées par l'acide phosphorique, et les dérivés solubles de la cellulose, tels que les carboxyméthylcelluloses (CMC). De tels substrats ne pouvaient nous convenir. En effet, à l'échelle industrielle, il ne peut être envisagé des prétraitements des déchets cellulosiques, étant donné le nombre de manipulations, la dépense d'énergie et le coût élevé qu'ils nécessitent.

C'est pourquoi, nous avons, pour notre part, préféré fournir au champignon un substrat non modifié utilisé notamment par REESE & LEVINSON (62) : la cellulose SOLKA FLOC. Dans la gamme qui nous était présentée, nous avons choisi la cellulose Solka Floc BW 200, d'un haut degré de pureté, et dont la dimension des particules est la plus faible (40 microns), afin que la surface de contact avec le microorganisme soit la plus élevée possible. Elle se présente sous la forme d'une poudre, dont le degré de blancheur est 83, obtenue à partir du bois de sapin par le procédé au sulfite et de composition chimique déterminée :

- cellulose	: 94%
- pentosanes	: 2,6%
- lignine	: 0,1%
- taux d'humidité	: 5-7%

B/ RAFLES DE MAIS :

Les déchets provenant de la récolte du maïs sont réduits, dans un broyeur à marteaux GONDARD puis au mixer, en une poudre hétérogène qui est fractionnée sur une gamme de tamis AFNOR. Dans la plupart de nos expériences, la fraction de rafles de maïs utilisée est celle recueillie après passage sur le tamis n° 23, dont l'ouverture de maille est 160 microns. Dans ce cas, la dimension des particules est proche de celle de la cellulose Solka Floc (40 microns).

Remarque : Les rafles de maïs étant un substrat naturel, elles contiennent en plus de la cellulose :

- des xylanes : la dégradation enzymatique produit du xylose que l'on révèle par chromatographie sur papier.
- de la lignine
- de l'amidon
- de l'azote sous forme minérale ou organique,
- des sels minéraux.

III-MILIEU MINERAL NUTRITIF DE REFERENCE :

SAUNDERS, SIU et GENEST (68) ont établi, empiriquement un milieu nutritif, modifié par WHITAKER (95), que HANSTEIN (21) utilise sans l'adjonction d'oligoéléments. La composition de ce milieu, pour un litre d'eau distillée, est la suivante :

<u>SELS</u>	<u>mg/l</u>	<u>Concentration ionique</u>	<u>mg/l</u>
NH_4NO_3	600	NH_4^+	135
NaNO_3	3800	Na^+	1847
KH_2PO_4	200	K^+	125
K_2HPO_4	150	Mg^{2+}	29,5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2000	NO_3^-	3237
Na_2HPO_4	1500	PO_4^{3-}	2620
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300	SO_4^{2-}	116,9

Le pH de cette solution est 6,6. Les études concernant l'influence du pH initial sur la culture de T. viride ont été effectuées par de nombreux auteurs. E. HANSTEIN (21) utilise le milieu que nous avons décrit, sans ajustement du pH; c'est-à-dire en conservant la valeur 6,5-6,6. Avec un autre milieu, B. NORKRANS (49) utilise un pH de 5,8 tandis que N. TOYAMA (80) décrit un pH optimum de 6,0 pour le milieu de Czapek modifié. Nous avons choisi un pH de 5,5 légèrement plus acide, afin d'éviter une contamination bactérienne possible, et parce que cette valeur est proche du pH optimum des cellulases secrétées par T. viride, que TOYAMA situe vers 5 (81), (83).

METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE DU MYCELIUM ET DE L'ATTAQUE DU SUBSTRAT CELLULOSIQUE.

Le dosage du mycelium dans les cultures sur des substrats insolubles tels que la cellulose Solka Floc ou les rafles de maïs, pose un problème : la croissance du champignon ne peut être évaluée par une méthode directe étant donné que la masse insoluble en suspension dans le milieu, c'est-à-dire la masse fongiale, contient à la fois le substrat non dégradé et le mycelium apparu. C'est pourquoi les mesures de la croissance de T. viride ont été réalisées par des méthodes indirectes.

Remarque : La plupart des auteurs suivent l'évolution des cultures de champignons cellulolytiques, en utilisant la mesure de l'activité cellulolytique des filtrats de culture (production de cellulases).

I - EXPERIENCES REALISEES SUR LA CELLULOSE SOLKA FLOC :

En se développant, le champignon utilise l'azote du milieu minéral pour synthétiser ses protéines. La cellulose Solka Floc en étant dépourvue, la quantité d'azote déterminée sur le résidu sec d'une culture, peut être attribuée au mycelium.

A/ Mode opératoire :

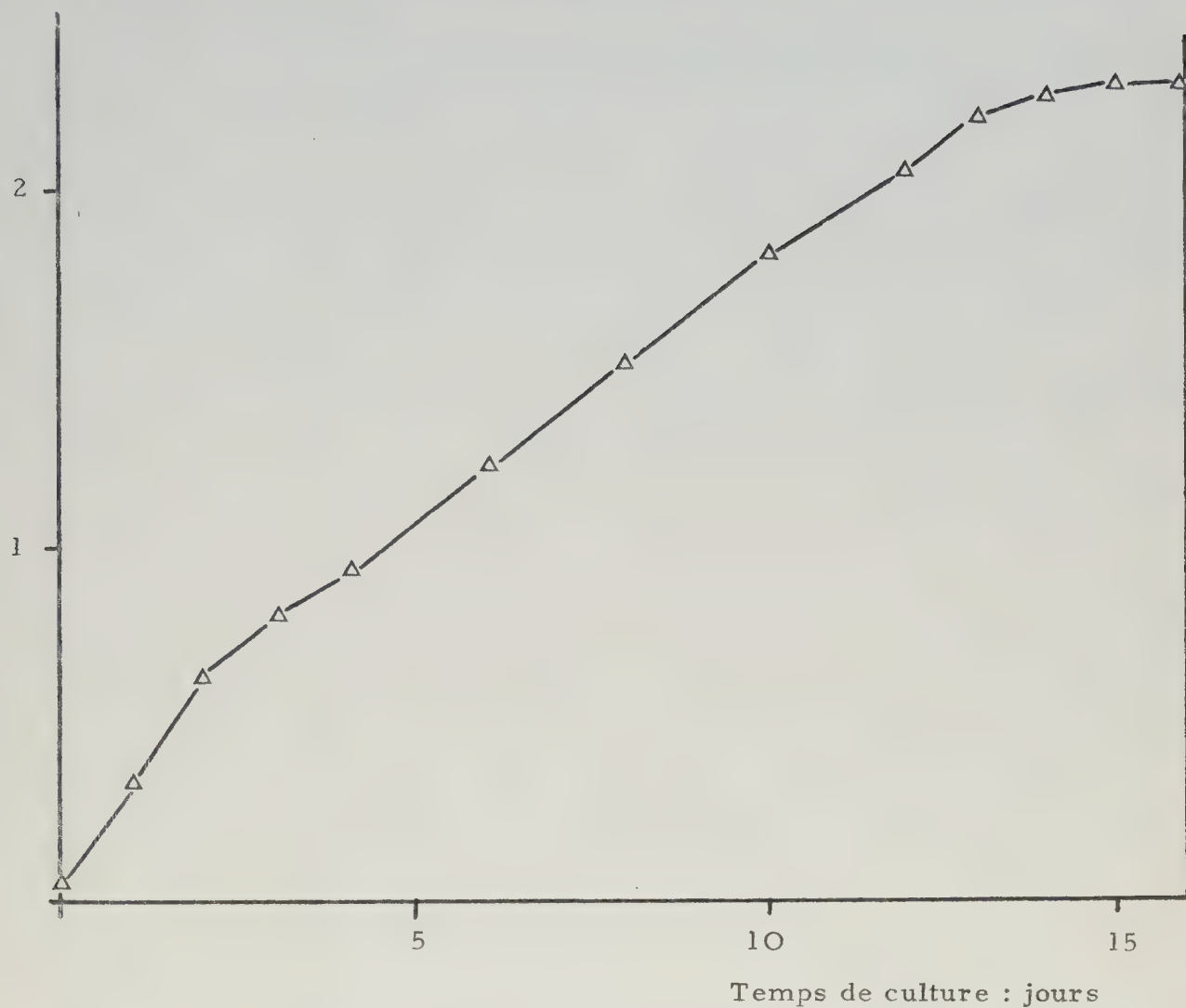
Nous dosons préalablement l'azote contenu dans le mycelium pur, récolté sur gélose et séché une nuit à 100°C. Ce taux s'élève à 12%. Un volume aliquote homogène, prélevé dans une culture contenant de la cellulose Solka Floc et du mycelium en suspension, c'est-à-dire la "masse fongiale", est centrifugée. Le culot est lavé trois fois avec dix fois son volume d'eau distillée afin d'éliminer les sels, et séché à 100°C pendant une nuit. La quantité d'azote est ensuite déterminée, après minéralisation, selon la méthode de KJELDAHL (86). En multipliant la valeur trouvée par le rapport $\frac{100}{12}$, nous obtenons la quantité de poids sec de mycelium contenue dans la fraction.

B/ Exemple :

Afin d'illustrer les résultats obtenus par cette méthode de dosage, voici un exemple d'une culture de T. viride réalisée sur cellulose Solka Floc dans les conditions suivantes :

Croissance du mycelium
g/l

GRAPHIQUE 1



Croissance de *Trichoderma Viride* sur
cellulose SOLKA FLOC 25 g/l évaluée
d'après le dosage de l'azote totale de la
masse fongiale

$$\text{Quantité de mycelium} = \frac{\text{quantité d'azote totale}}{12} \times 100$$

- volume de solution minérale de référence à pH 5,5 : 800 ml,
- concentration en cellulose Solka Floc : 25 g/l,
- volume de l'erlen de culture : 1 litre
- l'aération et le maintien du substrat, sont assurées simultanément par une agitation magnétique à l'aide d'un barreau aimanté enrobé de téflon, de 60 x 10 mm, tournant à raison de 5 tours/seconde.
- température d'incubation : 30°C
- ensemencement de la culture : 8 ml d'une préculture effectuée dans les conditions suivantes :
 - volume de solution minérale de référence à pH 5,5 : 100 ml,
 - cellulose Solka Floc : 1 g
 - autolysat de levure : 10 mg
 - volume de l'erlen de préculture : 250 ml,
 - agitation magnétique à l'aide d'un barreau aimanté enrobé de téflon de 40 x 8 mm tournant à raison de 3 tours/s
 - ensemencement effectué à partir d'un prélèvement sur tube de gélose glucosée
 - température d'incubation : 30°C
 - temps d'incubation : 11 jours.

Les dosages de mycelium sont effectués sur des prélèvements homogènes de 10 ml, dans les conditions que nous avons décrites.

Résultats : Le graphique 1 représente la croissance de T. viride, mesurée d'après l'évaluation de la quantité de mycelium par le dosage de l'azote total. Une dizaine d'expériences réalisées dans les mêmes conditions, nous a montré une variation des résultats de l'ordre de ± 4 %.

Le palier de croissance est atteint au quatorzième jour. En effet, des cultures incubées pendant des périodes supérieures à quinze jours, contiennent la même quantité de mycelium que celle obtenue après quatorze jours d'incubation, c'est-à-dire, environ 2,3 g/l.

II - EXPERIENCES REALISEES SUR RAFLES DE MAIS

La poudre obtenue après broyage et passage sur le tamis n° 23 de la gamme AFNOR, contient une quantité d'azote déterminée non négligeable, 0,88 %, dosée par la méthode de KJELDAHL que nous avons décrite précédemment. Le problème était donc de savoir si T. viride utilise cet azote pour synthétiser ses protéines. D'autre part, les rafles de maïs contiennent très peu de tryptophane, de l'ordre de 0,02 % tandis que le champignon en contient 1,2%. Deux méthodes de dosage du mycelium se présentaient donc à nous :

- la détermination de l'azote total,
- le dosage du tryptophane apparu dans la masse fongiale.

A/ Evaluation de la quantité du mycelium par le dosage d'azote total

1) Introduction

L'azote total est dosé sur les résidus séchés à 100°C pendant une nuit, obtenus après centrifugation de prélèvements de 10 ml, effectués dans les cultures à des temps variables. Trois possibilités nous sont offertes :

a - dans le cas le plus favorable, T. viride en se développant, utilise en totalité l'azote contenu initialement dans les rafles de maïs, et la valeur déterminée en fin de culture (M2) est attribuée en totalité au mycelium.

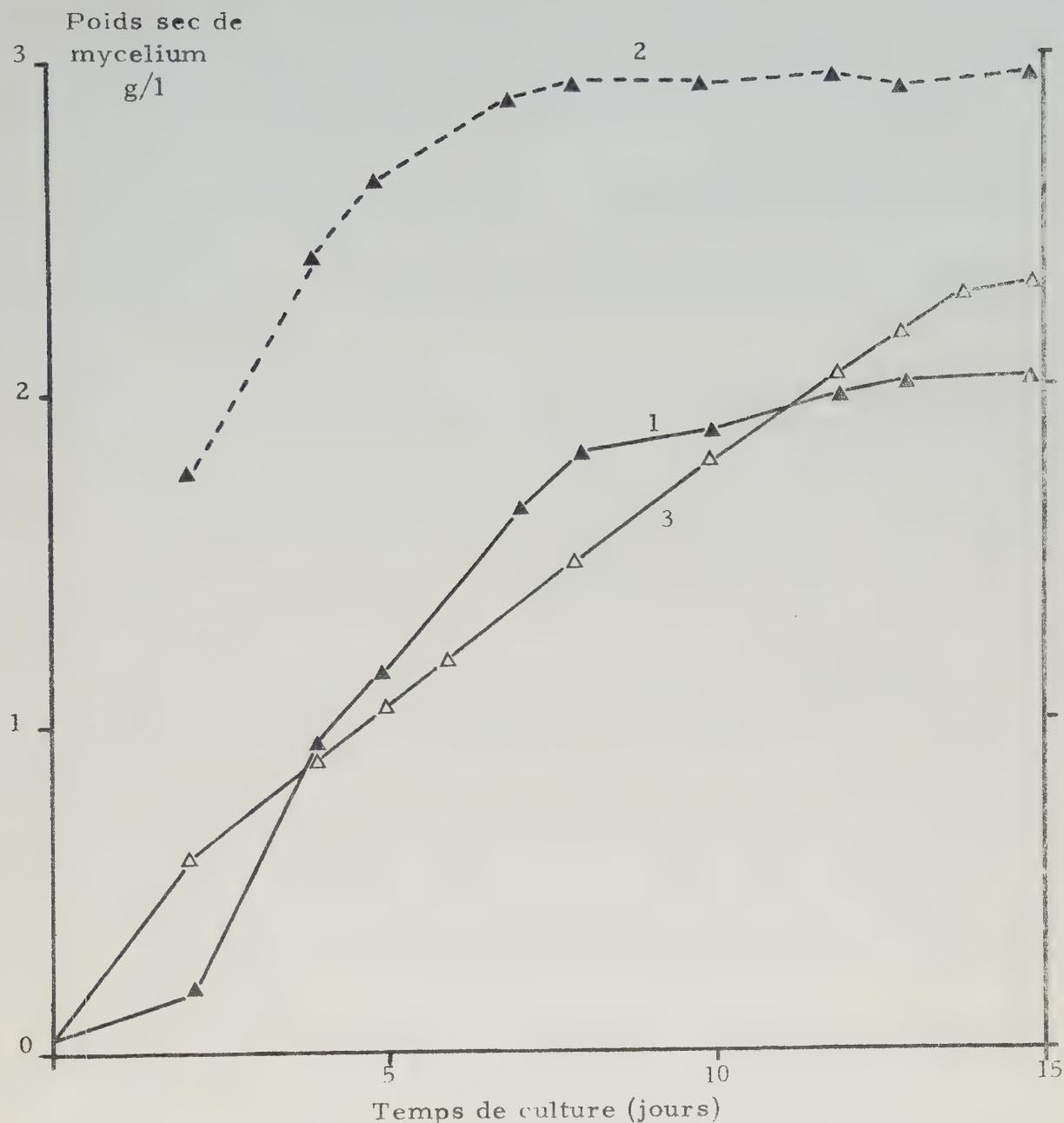
b - dans le cas le plus défavorable, T. viride n'utilise pas l'azote présent dans les rafles de maïs, et la différence entre la valeur globale obtenue en fin de culture et la quantité initiale d'azote contenue dans le substrat, est attribuée au mycelium (M1).

c - le champignon utilise seulement une partie de l'azote contenu dans les rafles de maïs et la quantité de mycelium est alors comprise entre les deux valeurs déterminées précédemment.

2) Exemple : Une culture de T. viride est réalisée sur des rafles de maïs, broyées et fractionnées sur le tamis n°23 de la gamme Afnor, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la culture sur cellulose Solka Floc décrite précédemment.

- la concentration en rafles de maïs est 25 g/l
- la préculture est effectuée sur cellulose Solka Floc à 10 g/l
- Les dosages d'azote ont été effectués selon la méthode de Kjeldahl.
- Le graphique 2 représente deux courbes de croissance de T. viride sur rafles de maïs.

GRAPHIQUE 2



Croissance de *T. viride* sur rafles de maïs tamisées sur le tamis n° 23 de la gamme AFNOR, et sur cellulose SOLKA-FLOC, à 25 g/l.

- 1.▲ : Croissance du mycelium sur rafles de maïs, évaluée d'après la quantité d'azote total apparue dans la masse fongiale : cas le plus défavorable.
- 2.▲ : Croissance du mycelium sur rafles de maïs, évaluée d'après la quantité d'azote total dosée dans la masse fongiale : cas le plus favorable.
- 3.△ : Croissance du mycelium sur cellulose SOLKA-FLOC.

Courbe 1 : Les quantités de mycelium sont calculées en multipliant par $\frac{100}{12}$ (paragraphe I), les valeurs obtenues en retranchant l'azote total, dosé préalablement sur le résidu sec du prélèvement de 10 ml effectué à l'instant 0, de l'azote total dosé dans les mêmes conditions à l'instant t : cas le plus défavorable.

Courbe 2 : Les quantités de mycelium sont déterminées en multipliant par $\frac{100}{12}$ l'azote total dosé sur le résidu sec d'un prélèvement de 10 ml effectué à l'instant t, sans retrancher l'azote contenu dans le résidu sec à l'instant 0, correspondant à la teneur en azote des rafles de maïs : cas le plus favorable.

3) Discussion : Les courbes 1 et 2 (graphique 2) que nous venons de définir, sont très distinctes et nous pouvons concevoir que la courbe réelle de croissance se situe entre les deux précédentes. Nous avons tracé sur le même graphique la courbe de croissance de T. viride sur la cellulose Solka Floc (courbe 3) et nous remarquons que le palier, en fin de culture, est aussi situé entre les courbes 1 et 2. De ce fait, nous ne pouvons conclure si les rafles de maïs stimulent ou inhibent la croissance de T. viride.

Les méthodes que nous venons de décrire ne nous permettent pas de définir la croissance du champignon sur rafles de maïs, c'est pourquoi nous avons évalué les quantités de mycelium par le dosage du tryptophane.

B) Evaluation de la quantité de mycelium par le dosage du tryptophane

1) Introduction et mode opératoire : Les rafles de maïs telles que nous les utilisons, contiennent très peu de tryptophane (environ 0,02 %) par rapport au mycelium de T. viride, dont le taux est 1,2%. L'évaluation de la quantité de mycelium par le dosage de cet aminoacide, nous a donc paru plus accessible.

Une série d'expériences est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, mais sur des concentrations en rafles de maïs variables : comprises entre 1 et 100 g/l. Des études cinétiques effectuées sur des cultures de T. viride nous ont montré que le palier de croissance est atteint entre le onzième et douzième jour d'incubation.

C'est pourquoi, afin de nous placer au palier de croissance, nous avons effectué les mesures après quatorze jours de culture.

10 ml ^{de} suspension sont centrifugés, les culots lavés trois fois avec dix fois leur volume d'eau distillée, séchés une nuit à 100°C, puis pesés. Chaque résidu sec est broyé en une poudre fine au mixer.

TABIEAU N°1 : Comparaison entre deux méthodes de dosage du mycelium produit dans des cultures de T.viride sur rafles de maïs broyées au GONDARD puis au mixer et tamisées.

M1 = Mycelium dosé d'après la quantité d'azote apparue dans le résidu sec des cultures (cas le plus défavorable)

M2 = Mycelium dosé d'après la quantité totale d'azote mesurée sur le résidu sec des cultures (cas le plus favorable).

M3 = Mycelium dosé d'après la quantité de tryptophane apparue dans le résidu sec des cultures.

Concentra- tion en	Poids sec total ré-	M1	M2	M3	M1 - M3
rafles de maïs dans la culture	siduel de la culture a- près 14 j d'incubation g/1 PST	$N_{14} - N_0$ $\frac{14}{12} - 100^2$	N_{14} $\frac{14}{12} - 100^2$	$T_{14} - T_0$ $\frac{14}{12} - 100^2$	$\frac{M1}{M1}$ %
		écart moyen 3-4 %	écart moyen 3-4 %	écart moyen 5 %	
1	0,46	0,12	0,15	0,114	+ 5
5	2,29	0,55	0,71	0,55	0
10	4,86	0,87	1,22	0,91	- 4,5
15	6,67	1,45	1,93	1,42	+ 2
20	8,21	1,86	2,45	1,68	+ 10
25	11,05	2,03	2,83	2,11	- 4
50	32,04	3	5,3		
75	57,75	2,5	6,7	5,9	- 135
100	80	2,1	8,6		

No : Azote total dosé sur le poids sec de 10ml de culture à l'instant 0.

N₁₄ : Azote total dosé sur le poids sec de 10ml de culture à 14 jours

T₀ : Tryptophane dosé sur le poids sec de 10ml de culture à l'instant 0

T₁₄ : Tryptophane dosé sur le poids sec de 10ml de culture à 14 jours.

Le dosage du tryptophane est effectué sur les résidus sec selon la méthode colorimétrique au p. diméthylaminobenzaldéhyde de W.C. HESS et M.X. SULLIVAN (24). La poudre obtenue précédemment est introduite dans une ampoule de 10 ml, et 2 ml de soude N contenant 2,5% de gélatine sont rajoutés. L'ampoule est scellée et placée à 110-120°C dans une étuve pendant deux heures. Après refroidissement, et ouverture de l'ampoule, nous versons 1 ml d'eau distillée et nous agitions.

Remarque : La réaction alcaline a provoqué une coloration brune. C'est pourquoi le dosage colorimétrique est effectué de la manière suivante :

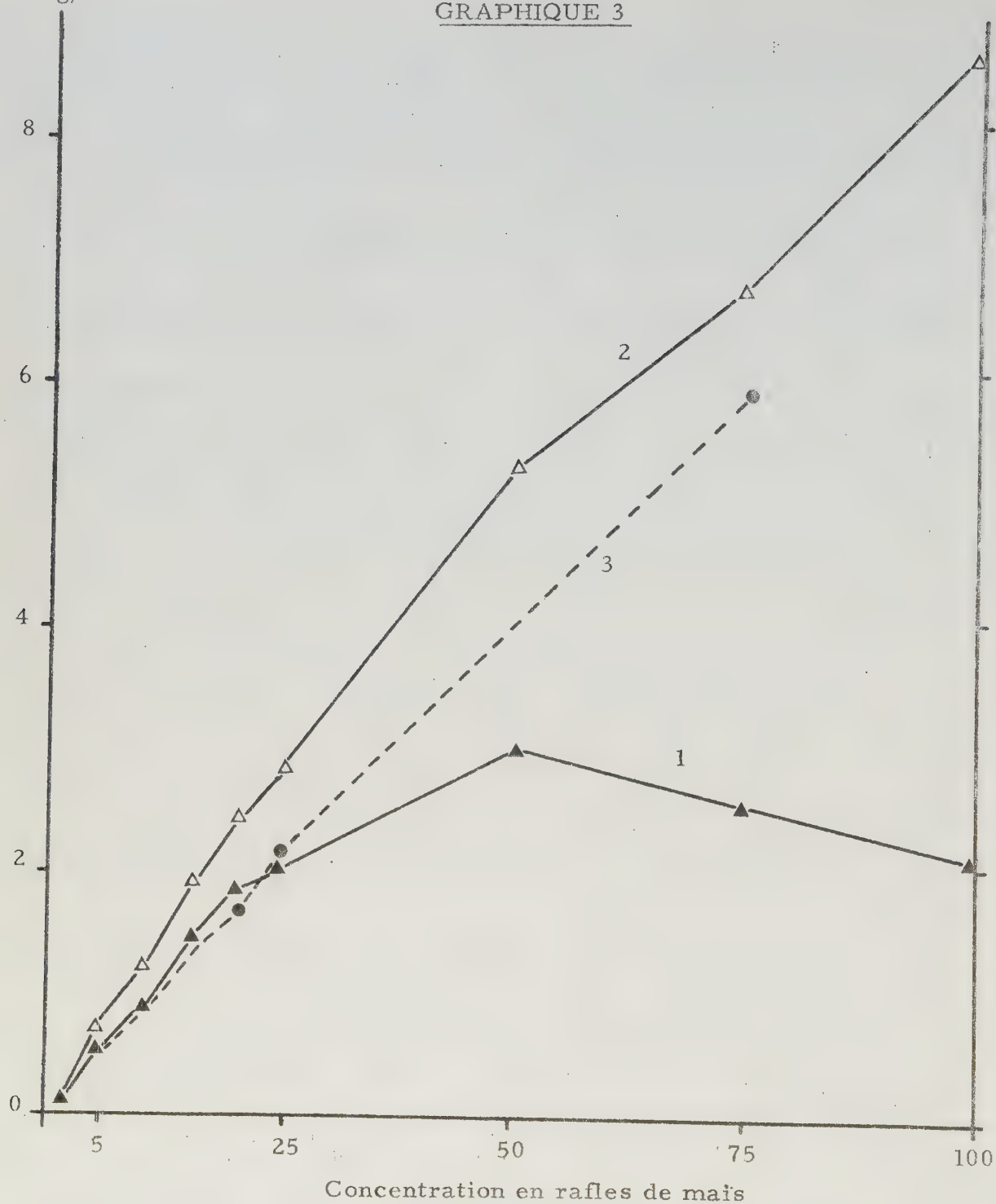
Dans un ballon jaugé de 50 ml, nous introduisons successivement : 1 ml de l'hydrolysate obtenu précédemment, 4 ml d'eau, 0,5 ml de solution de p. diméthylaminobenzaldéhyde (à 2,5 % dans H_2SO_4 à 10%), 0,2 ml de solution aqueuse contenant 2% de $NaNO_3$ et 0,05% de $NaNO_2$, et 28 ml de HCL concentré. Après développement de la coloration, 30 à 40 minutes, le ballon jaugé est complété à 50 ml avec de l'alcool à 50%. La mesure colorimétrique est effectuée à l'électrophotomètre NEUNIER à 59 m μ . Pour chaque dosage, un essai à blanc est effectué dans les conditions que nous venons de décrire, en rajoutant successivement tous les réactifs à l'exception du p. diméthylaminobenzaldéhyde. Des mesures identiques sont réalisées sur les résidus secs obtenus à partir de prélèvements de 10 ml effectués sur les cultures, à l'instant 0 et sur du mycelium pur et sec récolté après culture sur glucose à 10 g/l. La courbe étalon du dosage colorimétrique est établie en traitant de la même façon que les rafles de maïs, les résidus secs des cultures ou le mycelium pur, des prises de 0,2 à 0,8 ml de solution de tryptophane de référence (1mg/ml) complétées à 1 ml avec de l'eau distillée.

Parallèlement à ces mesures, la croissance du mycelium est évaluée par le dosage d'azote dans les conditions que nous avons décrites plus haut.

2) Résultats et discussion : Le rapport de la quantité d'azote total du mycelium pur à sa teneur en tryptophane, correspond à 10. Le taux d'azote du mycelium étant de 12%, la quantité de mycelium contenue dans le résidu sec d'une culture, est obtenue en multipliant la quantité de tryptophane mesurée, par le rapport $10 \times \frac{100}{12}$ soit $\frac{1000}{12}$. Nous avons reporté dans le tableau 1 et sur le graphique 3 les résultats obtenus selon les deux méthodes de dosage : azote et tryptophane. Nous constatons que dans les cultures dont les concentrations en rafles de maïs sont comprises entre 1 et 25 g/l, les quantités de mycelium déterminées par le dosage de tryptophane correspondent sensiblement à celles trouvées par le dosage d'azote dans le cas le plus défavorable, c'est-à-dire déduction faite de l'azote initial contenu dans les rafles de

Production du mycelium
g/l

GRAPHIQUE 3



Quantité de mycelium produite dans les cultures de *T. viride* sur rafles de maïs à différentes concentrations, évaluées selon différentes méthodes.

- 1 ▲ Production de mycelium évaluée d'après le dosage d'azote dans le cas le plus défavorable.
- 2 △ Production de mycelium évaluée d'après le dosage d'azote dans le cas le plus favorable.
- 3 ● Production de mycelium évaluée d'après le dosage de tryptophane (valeurs réelles).

maïs. Au-delà de la concentration de 25 g/l, ces deux séries de valeurs ne se correspondent plus. C'est ainsi que pour la concentration de 75 g/l, la quantité de mycelium déterminée par le dosage du tryptophane est comprise entre les deux valeurs extrêmes trouvées par le dosage de l'azote.

Par la suite, nous avons été amenés à réaliser des cultures de T. viride sur rafles de maïs à la concentration de 25 g/l. ~~Par~~ cette valeur, l'erreur relative observée sur la quantité de mycelium calculée par le dosage d'azote est de - 4% par rapport à la valeur trouvée par le dosage du tryptophane.

Remarque : Nous avons repris l'expérience décrite précédemment concernant la cinétique de croissance de T. viride sur rafle de maïs à 25 g/l (graphique 2) en évaluant le mycelium par le dosage du tryptophane pour trois points de la courbe correspondant à des prélèvements effectués à cinq, onze et quatorze jours. Les valeurs obtenues correspondent à celles trouvées par le dosage d'azote dans le cas le plus défavorable (courbe 1, graphique 2), à moins cinq pour cent près.

3) Conclusions

La méthode relative au dosage du tryptophane est très délicate et peu conciliable avec les nombreux dosages en série nécessaires à notre étude.

Le dosage d'azote, calculé dans le cas le plus défavorable, c'est-à-dire en retranchant la quantité initiale contenue dans les rafles de maïs, de la valeur globale déterminée sur la masse fongiale, est donc la méthode que nous avons choisie pour évaluer la croissance de T. viride sur rafles de maïs, dont la concentration dans les cultures n'excède pas 25 g/l. Cette méthode donnant des résultats proches de la réalité, est de plus, simple à réaliser et indiquée pour des dosages en série.

III - DETERMINATION DE LA QUANTITE RESIDUELLE DU SUBSTRAT

La différence entre le poids sec de la masse fongiale et le poids sec de mycelium calculé par dosage de l'azote total, nous donne la quantité de cellulose Solka Flocc ou de rafles de maïs résiduelle.

EVALUATION DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DES

FILTRATS DE CULTURE

I) INTRODUCTION

Pour étudier le développement des cultures de micro-organismes cellulolytiques, de nombreux auteurs mesurent l'activité cellulolytique libérée ou la production de cellulases, en fonction du temps, en faisant agir les filtrats de cultures sur des substrats cellulosiques naturels, tels que les linters de coton, ou artificiels tels que les celluloses modifiées ou des dérivés solubles de la cellulose. Pour cette étude, divers principes de mesures sont utilisés.

- perte de poids du substrat, lorsque celui-ci est insoluble,
- dosage des sucres réducteurs libérés après attaque du substrat par les cellulases,
- détermination quantitative de la cellulose résiduelle ou solubilisée par des méthodes colorimétriques,
- mesure de la viscosité des solutions, lorsque le substrat de la réaction enzymatique est soluble.

Notre but étant d'intérêt pratique, les substrats choisis pour la mesure de l'activité cellulolytique des filtrats, sont ceux que nous utilisons pour la culture du micro-organisme : la cellulose Solka Floc BW 200 et les rafles de maïs obtenues après passage de la poudre sur le tamis n° 23 de la gamme Afnor. Ces substrats étant insolubles, les méthodes de mesures que nous avons utilisées sont :

- A) le dosage des sucres réducteurs libérés après l'action des filtrats de cultures sur la cellulose ou les rafles de maïs.
- B) dans certains cas, la perte de poids du substrat cellulosique.

A) Dosage des sucres réducteurs :

La méthode de HAGEDORN et JENSEN, modifiée par ISEKUTZ et BOTH (19) permet de doser le pouvoir réducteur global, libéré pendant la réaction enzymatique, que l'on exprime en poids de glucose. L'avantage de cette méthode est d'être simple et rapide. Elle permet de doser des quantités importantes de sucres dans une gamme très étendue, correspondant à des concentrations en glucose comprises entre 0,6 et 16 mg/ml.

Les mesures sont effectuées sur des prélèvements des solutions, obtenues après centrifugation du milieu réactionnel.

Dans quelques cas, nous avons été amenés à déterminer la nature et les quantités absolues des sucres libérés après la dégradation de la cellulose, par chromatographie de partage, sur papier Whatman N° 1 dans le solvant : butanol, acide acétique, eau (70), (18), (12).

Remarque : La valeur réelle de l'activité cellulolytique des filtrats de cultures est obtenue, en déduisant de la quantité totale de sucres réducteurs libérés après l'attaque des filtrats, la valeur trouvée avant la réaction enzymatique et correspondant aux sucres réducteurs libérés pendant la culture et présents dans le milieu réactionnel au temps 0.

B) Mesure de la perte de poids du substrat cellulosique :

Après la réaction, enzymatique, les milieux sont centrifugés. Les culots sont lavés trois fois avec dix fois leurs volumes d'eau distillée, séchés à 100°C pendant une nuit, et pesés.

Nous exprimons les résultats obtenus en pourcentages de perte de poids, qui illustrent mieux l'importance de la dégradation que les valeurs absolues.

II - OBTENTION ET CONSERVATION DES FILTRATS :

Les cultures sont centrifugées à 5000 tours/min. et les surnageants filtrés sur papier Whatman n° 1. Les filtrats ainsi obtenus, libres de cellules, contiennent divers enzymes de labilité variable. C'est pourquoi ils sont conservés à 4°C après addition d'un antiseptique puissant : le merthiolate ($\equiv$ éthylthiomercurisalicylate de sodium), à raison de 20 mg/l. Nous avons été amenés à mesurer l'activité des filtrats après des temps de conservation à 4°C, plus ou moins longs : le pouvoir cellulolytique des filtrats provenant de cultures sur cellulose Solka Floc, décroît de 10% en deux mois, tandis que les filtrats provenant des cultures sur rafles de maïs conservent leur activité initiale pendant un temps beaucoup plus long.

III - RECHERCHE ET MISE AU POINT D'UN TEST DE MESURE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DES FILTRATS DE CULTURE

Deux cultures de T. viride ont été réalisées, l'une sur de la cellulose Solka Floc, à 25 g/l, l'autre sur des rafles de maïs tamisées, à la même concentration, dans les conditions que nous avons décrites à la page 19.

Les substrats utilisés dans les réactions enzymati-

que étant insolubles, nous avons recherché en premier lieu si l'agitation du milieu était indispensable.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration du substrat sur l'activité cellulolytique, puis déterminé un temps d'incubation convenable, par une étude cinétique de la réaction enzymatique.

A/ Influence de l'agitation sur l'activité cellulolytique d'un filtrat de culture

Les expériences ont été effectuées sur le filtrat provenant de la culture sur cellulose Solka Floc incubée pendant quatorze jours.

1) Conditions opératoires :

Deux essais ont été réalisés, dont l'un est agité par un mouvement de va-et-vient, grâce à un agitateur secoueur.

- quantité de cellulose Solka Floc : 6 g.
- volume des filtrats de culture : 60 ml
- volume des erlens d'essais : 1 litre
- température d'incubation : 40°C (81)
- pH de la réaction : 5 (81)

La fréquence de l'agitation est d'une demi-période par seconde, la course du chariot de 80 mm.

- Les prélèvements effectués sont de 5 ml.

2) Résultats et discussions :

(Graphique 4)

Après quarante huit heures de réaction enzymatique, la différence d'activité est de 10%, en faveur de l'essai non agité. L'agitation n'est donc pas nécessaire pour une bonne évolution de l'activité cellulolytique. Cependant, pour conserver une certaine homogénéité du milieu réactionnel, il est préférable d'opérer en "couche mince" c'est-à-dire que le rapport entre la surface du milieu réactionnel et sa hauteur, doit être très grand. Ces conditions sont réalisées en utilisant un erlen dont le volume est environ vingt fois supérieur à celui de la suspension.

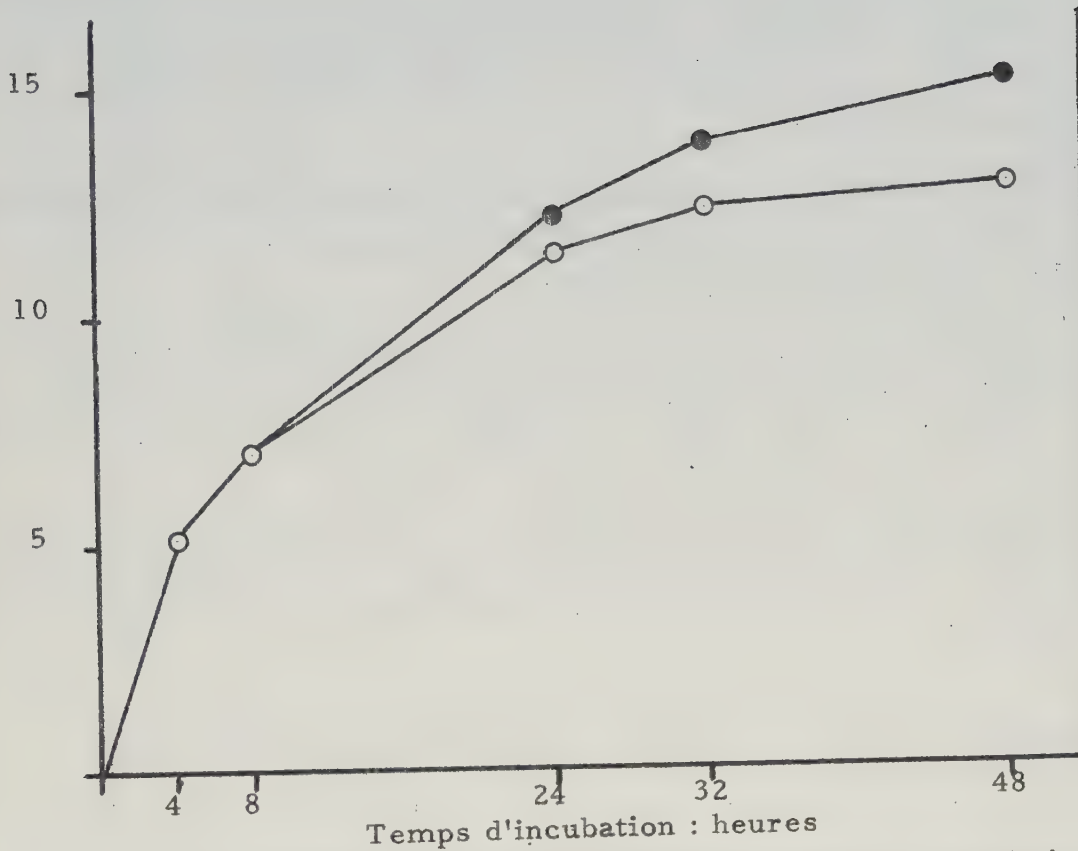
3) Conclusions

D'après les observations précédentes, nous avons mis au point la technique opératoire suivante :

Le volume des essais enzymatiques varie selon le but que l'on s'est fixé : étude cinétique de l'activité cellulolytique ou influence de divers facteurs sur l'activité cellulolytique. Dans le premier cas, nous opérons sur un volume de

GRAPHIQUE 4

Activité
Cellulolytique
en g de glucose libéré
par litre.



INFLUENCE DE L'AGITATION sur l'activité cellulolytique d'un filtrat de culture de T. Viride sur cellulose Solka Floc à 25 g/l mesurée d'après le pouvoir réducteur libéré exprimé en g de glucose par litre.

- 1 - ● — ● Essai sans agitation
2 - ○ — ○ Essai avec agitation.

60 ml, dans le second sur un volume de 5 ml. Supposons que nous ayons choisi cette dernière valeur : dans un erlen de 100 ml, une quantité déterminée de substrat cellulosique, cellulose Solka Floc ou rafles de maïs, est introduite, sur lequel sont versés lentement les 5 ml de filtrat. Après avoir attendu que la poudre cellulosique soit totalement imbibée, (environ trente minutes), nous agitons légèrement l'erlen deux ou trois fois à la main, afin d'homogénéiser le milieu réactionnel. Nous laissons alors la réaction se développer à la température de 40°C.

B/ Influence de la concentration du substrat dans la réaction sur l'activité cellulolytique des filtrats :

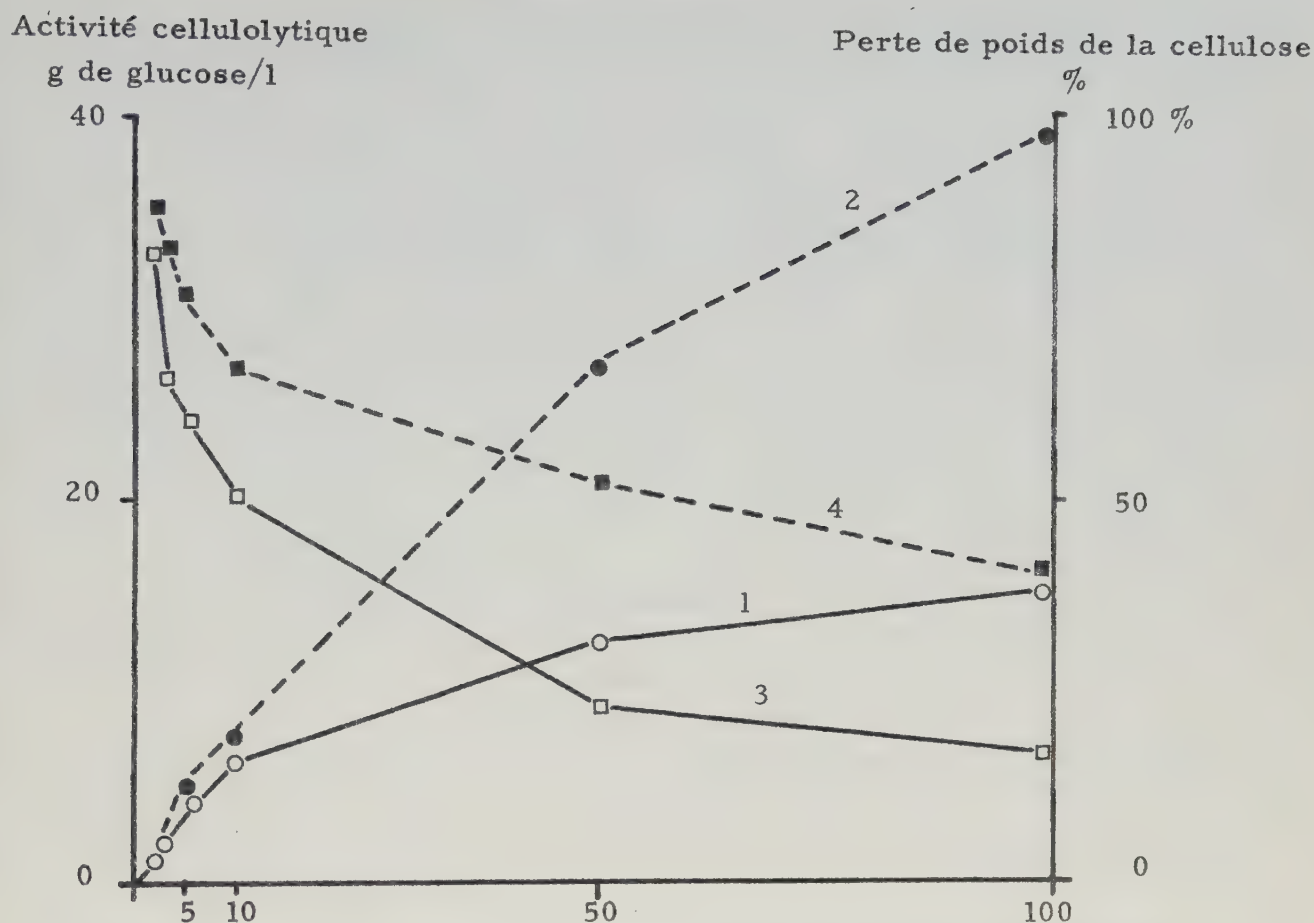
1) Conditions opératoires :

Les études ont été réalisées comparativement sur le filtrat provenant des cultures effectuées sur cellulose Solka Floc ou sur rafles de maïs. Le substrat des réactions enzymatiques choisi, est la cellulose Solka Floc dont la concentration varie de 1 à 100 g/l.

Afin d'avoir des quantités de substrat résiduel facilement mesurables, et en respectant les conditions déterminées précédemment concernant le rapport entre le volume de l'erlen et celui de l'essai enzymatique, nous avons opéré de la manière suivante :

: <u>TABLERAU N°2</u> : Conditions opératoires utilisées pour l'étude de l'influence de la concentration de cellulose sur l'activité cellulolytique des filtrats de cultures effectuées sur cellulose et rafles de maïs. :							
: Concentration en cellulose Solka Floc dans l'essai enzymatique g/l:	: 1	: 2	: 5	: 10	: 5	: 100	:
: Volume de filtrat : ml	: 25	: 25	: 5	: 5	: 5	: 5	:
: Quantité de cellulose:mg:	: 25	: 50	: 25	: 50	: 250	: 500	:
: Volume des erlens : ml	: 500	: 500	: 100	: 100	: 100	: 100	:
: <u>Volume des erlens</u> :	: 20	: 20	: 20	: 20	: 20	: 20	:
: Volume des essais :	:	:	:	:	:	:	:

GRAPHIQUE 5



Concentration en cellulose Solka Floc dans les essais enzymatiques

Etude comparée des propriétés des filtrats de cultures de *T. viride* effectuées sur cellulose ou sur rafles de maïs à 25 g/l.

Influence de la concentration en cellulose, dans les essais enzymatiques, sur l'activité cellulolytique des filtrats de cultures, mesurée d'après le pouvoir réducteur libéré en 48 h., évalué en g de glucose par litre - sur le pourcentage de sa perte de poids.

- 1 ○—○ Filtrat provenant de la culture sur cellulose ; activité cellulolytique
- 2 ●—● Filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs : activité cellulolytique
- 3 □—□ Filtrat de culture sur cellulose : perte de poids de la cellulose : %
- 4 ■—■ " " " rafles de maïs " " " : %

Les filtrats sont obtenus après quatorze jours d'incubation des cultures.

- pH : 5
- température : 40°C
- temps d'incubation : 48 heures. Ce temps a été choisi car des études cinétiques nous ont montré qu'il correspond sensiblement au palier de la réaction enzymatique (graphique 6, courbe 1).

L'activité cellulolytique est évaluée dans chaque essai selon les deux méthodes :

- mesure du pouvoir réducteur global en fin de réaction, exprimé en g de glucose par litre.
- pourcentage de perte de poids du substrat (cellulose Solka Floc).

2) Résultats et discussion : (graphique n° 5)

Les courbes de mesures représentées sur le graphique 5 nous permettent de faire plusieurs remarques :

a) - les quantités de sucres réducteurs libérés par les deux filtrats varient dans le même sens, en valeurs absolues, que la concentration de cellulose Solka Floc (courbes 1 et 2). Les quantités absolues de substrat dégradé, qui ne figurent pas sur le graphique 5, évoluent selon la même loi et parallèlement aux premières.

b) - pour de faibles concentrations en cellulose, 1 à 2 g/l, le filtrat provenant de la culture sur cellulose et le filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs, dégradent la Solka Floc dans un rapport très élevé, puisque le pourcentage de perte de poids du substrat atteint 82% dans le premier cas et 88 % dans le second (courbes 3 et 4). Ces résultats sont importants : En effet, E.T. REESE (58) a décrit une étude semblable dans laquelle le pourcentage de conversion de la cellulose Solka Floc en glucose, par un filtrat provenant d'une culture de T. Viride sur ce même substrat, atteint seulement 50 %, pour une concentration de 1 g/l de cellulose.

c) - lorsque la concentration en cellulose Solka Floc augmente, son pourcentage de conversion en sucres réducteurs diminue rapidement dans le cas de l'attaque par le filtrat provenant de la culture sur cellulose (courbe 3) pour atteindre 16% seulement, à la concentration de 100 g/l du substrat. Dans le cas de l'attaque par le filtrat provenant de la culture sur rafle de maïs, le taux de dégradation de la cellulose Solka Floc décroît moins rapidement puisque 40% sont encore dégradés à la concentration de 100 g/l (courbe 4).

d) quelle que soit la concentration de la cellulose Solka Floc dans les essais enzymatiques, le filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs est beaucoup plus actif sur la cellulose Solka Floc, que celui provenant de la culture sur cellulose Solka Floc.

A titre d'exemple, considérons les essais dans lesquels la concentration en cellulose est : 100 g/l :

Le filtrat provenant de la culture sur cellulose Solka Floc, libère en 48 heures, 15 g/l de sucres réducteurs, évalués en glucose, tandis que le filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs en libère 39 g/l dans les mêmes conditions, c'est-à-dire, 2,6 fois plus. Ces différences essentielles peuvent s'expliquer par le fait que les rafles de maïs, substrat naturel, contiennent des substances minérales ou organiques, qui stimulent la production de cellulases pendant la culture.

3) Conclusions :

Notre but étant d'obtenir des solutions sucrées les plus concentrées, nous avons recherché une production maximum de sucres réducteurs, plutôt qu'un pourcentage élevé de dégradation du substrat cellulosique. C'est pourquoi, dans les essais enzymatiques ultérieurs, nous avons choisi de faire agir les filtrats de cultures, obtenus dans des conditions variées, soit sur de la cellulose Solka Floc, soit sur rafles de maïs à une concentration de 100 g/litre.

C/ Cinétique de la dégradation cellulolytique par les filtrats de culture - Choix du temps de la réaction :

1) Introduction :

Une cinétique enzymatique évolue vers un palier après un certain temps de réaction. Les données de la littérature sont très différentes, en ce qui concerne la cinétique de la dégradation de la cellulose par les cellulases, du fait de la multiplicité des méthodes de cultures et d'essais enzymatiques utilisés. C'est pourquoi, nous avons déterminé un temps de réaction convenable, proche du palier d'activité des filtrats, en réalisant une étude cinétique de l'action des filtrats de cultures, sur la cellulose Solka Floc à 100 g/l.

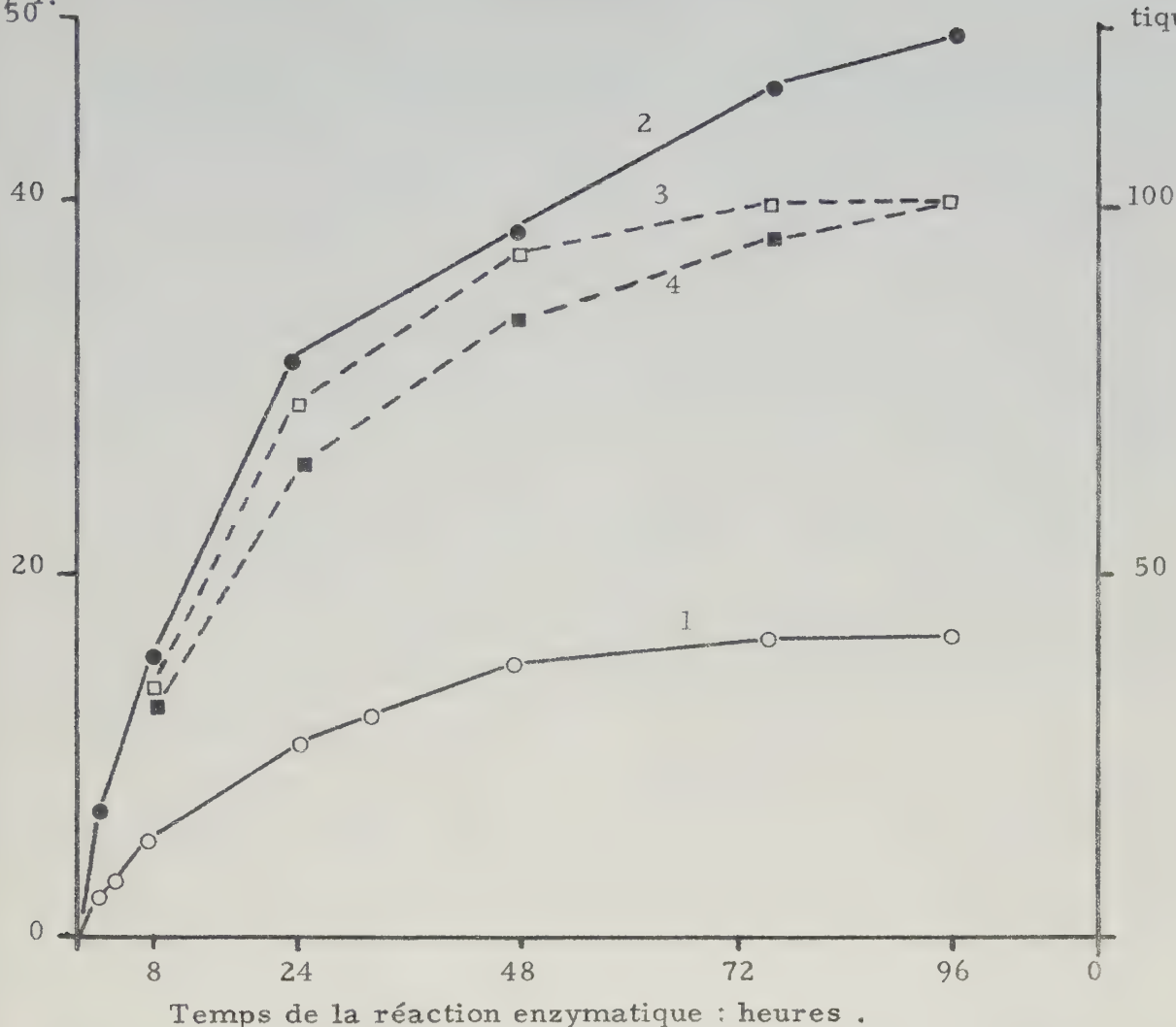
2) Conditions opératoires :

Une étude cinétique comporte de nombreux prélèvements.

Activité cellulolytique
des filtrats en g glu-
cose /l.

GRAPHIQUE 6

% de la réac-
tion enzyma-
tique.



Etude comparée des propriétés des filtrats de cultures de *T. viride* effectuées sur cellulose ou rafles de maïs à 25 g/l.

Cinétique des activités cellulolytiques des filtrats mesurés d'après le pouvoir réducteur libéré à partir de 100g de cellulose par litre et évaluées en g de glucose/l.

- 1 ○-○ Filtrat de culture de *T. viride* sur cellulose Solka-Floc à 25 g/l.
- 2 ●-● " " " sur rafles de maïs à 25 g/l
- 3 □-□ Pourcentage de la réaction enzymatique effectuée avec le filtrat de culture sur cellulose : la base de 100 est attribuée à l'activité cellulolytique obtenue en 96 heures.
- 4 ■-■ Pourcentage de la réaction enzymatique effectuée avec le filtrat de culture sur rafles de maïs : la base 100 est attribuée à l'activité cellulolytique obtenue en 96 heures.

C'est pourquoi, nous avons opéré sur des volumes de filtrats relativement importants :

Les filtrats proviennent des cultures effectuées, soit sur cellulose Solka Floc, soit sur rafles de maïs, incubées pendant quatorze jours.

- Volume des filtrats : 60 ml
- Volume des erlens : 1 litre
- pH des réactions : 5
- température d'incubation : 40°C
- Cellulose Solka Floc : 6 g.

3) Résultats et discussions : (Graphique 6)

Le graphique 6 représente les activités cellulolytiques des deux filtrats (courbes 1 et 2), et le stade des réactions enzymatiques en fonction du temps, en prenant comme base de 100, les activités mesurées après 96 heures de réaction (courbes 3 et 4).

Nous remarquons que le palier de l'activité cellulolytique du filtrat provenant de la culture sur cellulose Solka Floc, est atteint après 72 heures de réaction, où 16 g de sucres réducteurs sont libérés, tandis que l'activité cellulolytique du filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs continue de croître après 72 heures.

L'accroissement de l'activité cellulolytique entre 48 et 96 heures, étant inférieur à 10% dans le premier cas, (courbe 3) et de 15% dans le second (courbe 4), nous avons choisi un temps d'incubation de 48 heures pour les essais ultérieurs, en extrapolant ou en vérifiant dans certains cas, les valeurs obtenues à celles correspondant à 96 heures de réaction.

Remarque : Nous avons déterminé, par chromatographie analytique et quantitative sur papier, la nature et les quantités relatives des sucres réducteurs libérés après 48 heures de réaction.

Mode opératoire :

Papier Whatman n° 1

Solvant : Butanol, acide acétique, eau
(70 : 18 : 12)

Temps de migration : 24 heures

Température : 25°C

Réactif : phosphate d'aniline (4)

L'analyse des sucres est effectuée à l'aide de témoins, et le dosage, par évaluation de la surface des taches au planimètre.

Les valeurs obtenues sont décrites dans le tableau n°3 ci-dessous :

Tableau n°3 : Nature et quantité de sucres réducteurs libérés après 48 heures de réaction enzymatique par les filtrats provenant des cultures effectuées, soit sur cellulose Solka Floc, soit sur rafles de maïs, à 25 g/l, et agissant sur la cellulose Solka Floc à 100 g/l.

Origine du Filtrat	Pouvoir réducteur global en glucose/l après 48h de réaction.	GLUCOSE g/l	CELIOBIOSE g/l	XYLOSE g/l
Culture sur cellulose	15,5	11,7	3,6	0,5
Culture sur rafles	38	33	5,5	3

N.B. : Les valeurs attribuées au pouvoir réducteur global, dans chaque cas, correspondent à l'activité cellulolytique réellement mesurée pendant les réactions enzymatiques, tandis que dans les valeurs correspondant aux glucose, cellobiose et xylose, sont incluses les quantités de sucres présentes avant les réactions enzymatiques et libérées pendant les cultures.

IV - CONDITIONS CHOISIES POUR L'EVALUATION DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE LIBEREE PENDANT LES CULTURES :

Au cours de nos travaux, de nombreuses mesures ont été réalisées sur des prélèvements de 10 ml effectués sur des cultures en cours de développement, en vue d'études cinétiques. Après centrifugation de ces prélèvements, le volume des surnageants n'est plus que de 8,5 ml, sur lesquels sont effectués parfois des dosages variés. C'est pourquoi nous avons choisi pour les mesures des activités cellulolytiques, un volume de 5 ml, constant pour toutes nos expériences.

- pH des réactions enzymatiques : 5, ajusté soit avec de l'acide citrique, $\frac{M}{5}$, soit avec Na_2HPO_4 , $\frac{M}{5}$ selon la valeur du pH du prélèvement.
- addition de merthiolate : 20 mg/l
- conservation des filtrats : 4°C
- quantité de substrat cellulosique : 500 mg (100 g/l)
- volume des erlens : 100 ml
- volume des filtrats : 5 ml
- durée des essais enzymatiques : 48 heures
- température de réaction : 40-42°C
- tous les erlens sont bouchés hermétiquement du fait de l'évaporation de l'eau.

Remarque : Dans certaines expériences, nous avons été amenés à mesurer l'activité cellulolytique des cultures globales contenant le mycelium et le substrat résiduel : Sur une partie aliquote, le mycelium est dosé et la quantité de substrat résiduel déterminée. Pour la réalisation des essais enzymatiques, nous rajoutons alors à 5 ml de culture globale, la quantité de substrat cellulosique nécessaire pour obtenir une valeur totale de 500 mg, soit 100 g/l.

Les conditions opératoires sont alors les mêmes que celles que nous venons de décrire pour la mesure de l'activité cellulolytique des filtrats. Le merthiolate ajouté, bloque la croissance du mycelium en conservant les cellules intactes.

FACTEURS CONSTANTS CHOISIS POUR LA

REALISATION DES CULTURES

De nombreux facteurs conditionnant le développement des champignons cellulolytiques, ont été décrits dans la littérature ; mais les résultats obtenus varient selon les microorganismes, et pour un même microorganisme, selon les auteurs. C'est pourquoi notre étude a eu pour objet la recherche de conditions optimum, favorisant la croissance de T. viride et la production de ses cellulases. Certaines expériences ont été réalisées sur cellulose Solka Floc, d'autres ont permis l'étude comparée de cultures effectuées sur cellulose et sur rafles de maïs.

Dans le travail qui suit, plusieurs facteurs ont été choisis selon les données de la littérature, et conservés constants :

- 1) - La température d'incubation des cultures : 30°C, selon E. HANSTEIN (21). N. TOYAMA (80) et B. NORKRANS (49) cultivent T. viride à 25°C.
 - 2) - Le milieu minéral est celui que nous avons décrit au début de ce chapitre, et tel que l'utilise E. HANSTEIN (21).
 - 3) - Le pH a été fixé à 5,5 pour les raisons que nous avons définies plus haut.
 - 4) - Lorsqu'un microorganisme est ensemencé dans un milieu neuf, à partir d'un tube de gélose glucosée, nous observons une période de latence pendant laquelle il synthétise les enzymes spécifiques du nouveau substrat qui lui est présenté. Afin de limiter ce phénomène, il est nécessaire d'adapter le microorganisme au substrat en réalisant une culture préalable ou "préculture", sur un volume réduit contenant cette substance, dans les mêmes conditions que la culture proprement dite. Cette méthode permet un ensemencement important de mycelium et d'en connaître la quantité ensemencée. Les précultures sont réalisées dans les conditions énoncées à la page 19.
- Chaque culture est ensemencée avec un volume de préculture correspondant à 1% de celui de la culture.
- 5) - Le temps d'incubation des cultures, lorsque des mesures cinétiques ne sont pas effectuées, est de 14 jours car le palier de croissance est alors atteint (graphique n°6)
 - 6) - La concentration du substrat cellulosique a primitivement été choisie égale à 25 g/l de façon empirique. En effet, la littérature mentionne des valeurs comprises entre 1 et 30 g/l. Par la suite, l'expérience nous a montré que 25 g/l était la concentration optimum.

La détermination de conditions optimum concernant d'autres facteurs, a fait l'objet d'études ultérieures.

C H A P I T R E I I

INFLUENCE DE L'AGITATION ET DE L' AERATION SUR
LA PRODUCTION DE MYCELIUM ET DES CELLULASES

o

o

o

- INTRODUCTION -

Certains auteurs cultivent les champignons dans des milieux, où le passage forcé de l'air est assuré grâce à des plaques de verre fritté ou des tubes perforés. Cette méthode semble permettre à la fois l'aération nécessaire au champignon et le maintien en suspension du substrat cellulosique insoluble. D'autres chercheurs combinent ces deux facteurs en réalisant des cultures agitées vivement, par des systèmes de va-et-vient. Une autre méthode possible est l'agitation magnétique, qui ne semble pas avoir été utilisée. Afin de faire un choix parmi ces diverses méthodes, nous avons réalisé plusieurs expériences relatives à chacune d'elles.

Un autre facteur important qui peut être assimilé au facteur aération, consiste dans le rapport entre le volume de culture et le volume du récipient.

Notre étude est décomposée en deux parties :

- Aération forcée et agitation
- Influence du rapport entre le volume de culture et le volume de l'erlen de culture.

AERATION FORCEE ET AGITATION

I - INTRODUCTION

La cellulose étant mise en suspension, il est possible d'en maintenir l'homogénéité par une agitation qui assure en même temps l'aération du milieu.

Inversement, une aération forcée du milieu de culture peut en maintenir l'homogénéité.

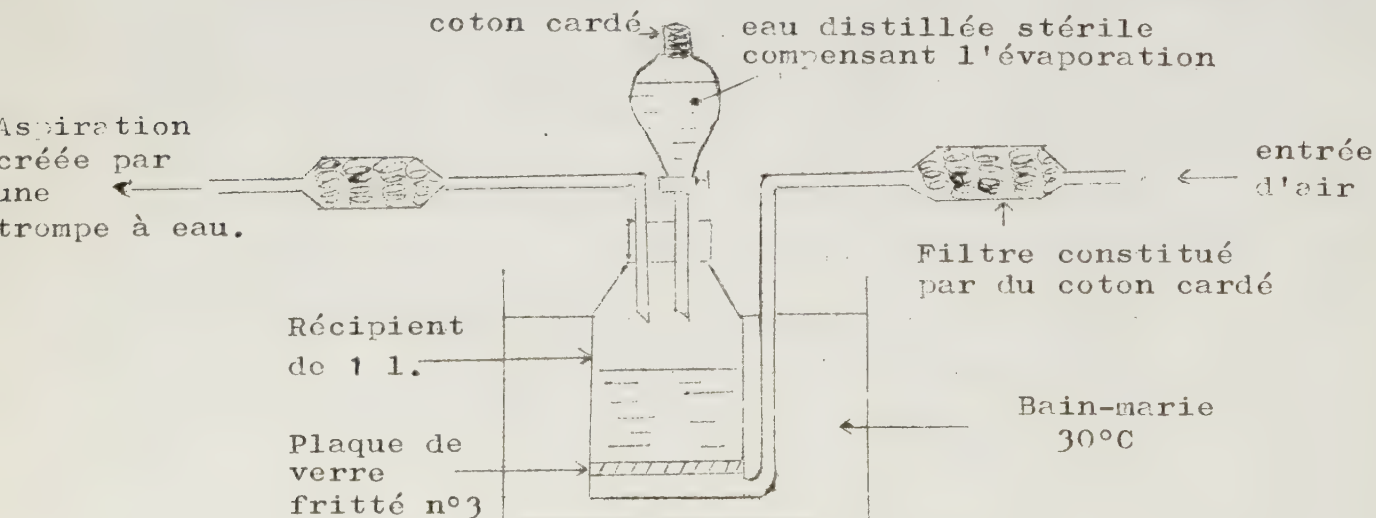
A partir de ces observations, deux séries d'expériences ont été réalisées, dans lesquelles les cultures sont soit aérées, grâce au passage de l'air à travers une plaque en verre fritté, contenue dans le milieu, soit agitées par un va-et-vient ou grâce à des barreaux aimantés en téflon introduits dans les cultures.

II - MATERIEL ET METHODE

A) Aération forcée

De nombreux auteurs ont utilisé les méthodes de THOMAS (77) ou WHITAKER (95) qui consistent en un brassage du milieu de culture, par l'air, grâce à des tubes perforés ou des plaques de verre fritté.

Nous avons réalisé, à une échelle plus réduite, un montage combinant les deux méthodes, selon le schéma suivant :



Plusieurs expériences ont été réalisées simultanément sur des volumes de culture de 600 à 800 ml et dans lesquelles la concentration en cellulose varie entre 5 et 25 g/l.

B/ Agitation : Deux méthodes d'agitation ont été utilisées :

1) Une agitation magnétique assurée grâce à un barreau enrobé de téflon, de 60 x 10 mm, tournant à 5 tours/s, dans un erlen de culture de 1 l.

Le volume de culture est dans ce cas 800 ml.

2) Une agitation mécanique assurée par un agitateur-secoueur ayant un mouvement de va-et-vient de 1,5 périodes/s et dont la course du chariot est 80 mm. Dans ce cas, le volume de culture maximum ne peut être que 1/5 de celui de l'erlen, soit 200 ml.

Chaque culture est réalisée dans les conditions décrites au chapitre I, . Pour chaque méthode, plusieurs concentrations de cellulose ont été utilisées ; nous ne donnons les résultats que pour la concentration de 25 g/l, car ils reflètent l'ensemble des valeurs obtenues.

III-RESULTATS - AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE CHAQUE METHODE :

Le tableau n°4 ci-dessous, illustre les résultats obtenus pour les cultures effectuées sur cellulose Solka Flocc à : 25 g/l.

Tableau n° 4 : Influence de l'aération forcée et de l'agitation sur les cultures de <i>T. viride</i> effectuées sur cellulose Solka Flocc à 25 g/l : mesure du poids sec de mycelium après 14 jours de culture.			
	Volume de culture	Poids sec de mycelium	
	ml	en g/l	
Aération forcée	600	1,3	
Agitation mécanique	200	1,6	
Agitation magnétique	800	2,2	

L'agitation magnétique est la méthode la plus favorable au développement de *T. viride*. D'autre part, l'aération forcée et l'agitation mécanique présentent des inconvénients :

A/ Aération forcée :

1) L'évaporation de l'eau est très intense et atteint des volumes de 3 à 400 ml par jour, lorsque l'aération est vive, du fait du passage de l'air dans le milieu maintenu à 30°C. En conséquence, les niveaux des cultures doivent être constamment ajustés.

2) Lorsque la concentration en cellulose dans le milieu est supérieure à 10 g/l, une aération, même très poussée, ne suffit pas à maintenir l'homogénéité de la culture et un dépôt de cellulose, au fond du récipient, a lieu. De ce fait, les mesures effectuées sont aléatoires.

B/ Agitation mécanique par va-et-vient

1) Le volume de culture est limité à $\frac{1}{5}$ de celui du récipient, soit 200 ml pour un erlen de 1 litre. Or, dans la suite de nos travaux, nous devons être amenés à effectuer de nombreux prélèvements impliquant des volumes de cultures assez importants.

2) L'agitation vive et saccadée, créée par le mouvement de l'agitateur secoueur, provoque un dépôt important de la masse fongiale sur les parois du récipient de culture.

IV - CONCLUSIONS

Pour les raisons que nous venons d'énoncer, notre choix a porté sur la méthode consistant en une agitation magnétique modérée qui permet à la fois de maintenir le substrat cellulosique en suspension et d'assurer l'aération du milieu. Les cultures seront réalisées en erlen ; la dimension et la vitesse de rotation du barreau aimanté, dépendront des volumes de cultures et des erlens utilisés.

INFLUENCE DU RAPPORT ENTRE LE VOLUME DE L'ERLEN DE CULTURE ET LE VOLUME DE CULTURE

I - INTRODUCTION : Le rapport entre le volume de culture et le volume de l'erlen de culture peut être assimilé au facteur aération puisque les surfaces de contact entre les suspensions et l'air varient dans les différents cas. Ainsi l'aération sera plus intense, dans une culture dont le volume est dix fois inférieur à celui de l'erlen, que dans une culture où ce rapport est ramené à deux.

Dans les expériences qui suivent, le développement des cultures a été évalué par la mesure de la production de mycelium et de l'activité cellulolytique des filtrats.

II - CONDITIONS OPERATOIRES : Les conditions de cultures utilisées sont celles que nous avons décrites au chapitre I. (pages 19 et 39). Les différentes cultures, dont le volume est constant et égal à 200 ml, sont réalisées dans des erlens de volume différent : 250, 500, 1000, 2000 ml. Pour chaque culture, un barreau aimanté de taille et de vitesse de rotation différentes, a été utilisé afin d'obtenir une agitation comparable.

La concentration en cellulose SOLKA FLOC dans les milieux est de 25 g/l, et le temps d'incubation, correspondant au palier de croissance, de 14 jours.

Des mesures de croissance et d'activité cellulolytique effectuées sur des prélèvements, ont été réalisées au 7ème jour.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS : Les résultats obtenus figurent dans le tableau n°5 ci-dessous :

TABLERAU n° 5 : Influence du rapport entre le volume de l'erlen et le volume de culture sur la croissance de T. viridis dans des cultures sur cellulose SOLKA FLOC à 25 g/l. Le volume choisi est de 200 ml.

Essais :	Taille de l'erlen :	Rapport des volumes erlens :	Temps d'incubation en jours :	Mycelium g/l :	pH :	Activité cel- lulolytique en g de glu- cose par l. :
1	250	8/10	7	1,74	6,2	6,150
2	500	4/10	7	x	6,3	x
3	1000	2/10	7	2,06	6,3	6,980
4	2000	1/10	7	2,12	6,4	7,050
1	250	8/10	14	2,3	6,7	14,500
2	500	4/10	14	2,32	6,7	14,350
3	1000	2/10	14	2,42	6,7	13,370
4	2000	1/10	14	2,41	6,7	16,1

A/ Production de Mycelium : Les quantités de Mycelium obtenues en fin de culture (14 jours) sont sensiblement égales,

avec un léger excès de 5 % dans les essais 3 et 4. Mais au 7ème jour, la différence entre les essais 1 et 4 est de 20%.

B/ Activité cellulolytique

Comme dans le cas de la production du mycelium, l'activité cellulolytique des filtrats mesurée après 14 jours d'incubation des cultures, semble en faveur de l'essai 4 (erlen de 2000 ml) avec une valeur supérieure de 11% à celle de l'essai 1 (erlen de 250 ml). Cependant, les variations observées entre les différents essais ne sont pas très significatives puisque le minimum d'activité est obtenue dans l'essai 3 (erlen de 1000 ml).

C/ Discussion

Il semble que la croissance de T. viride soit plus rapide dans les cultures dont le volume est très inférieur à celui de l'erlen, mais les paliers de croissance d'une part, et les activités cellulolytiques des filtrats, d'autre part, tendent vers des valeurs communes, pour chaque essai, dont les variations extrêmes de l'ordre de 10 %, ne sont pas significatives.

Par la suite, nous avons été amenés à utiliser des volumes de culture assez importants. En effet :

- les mesures cinétiques du développement de T.viride nécessitent de nombreux prélèvements de 10 ml.

- pendant l'incubation des cultures, nous avons fait en sorte que le volume global de culture et son rapport avec celui de l'erlen, varient peu malgré les prélèvements qui sont effectués, afin de limiter les erreurs de mesures.

- de nombreux essais de cultures devant être effectués simultanément, nous avons été limités par la taille des erlens.

Pour ces raisons, notre choix du volume de culture s'est porté sur 800 ml pour un erlen de 1 litre, constituant ainsi le rapport 8/10.

- CONCLUSION -

Les expériences que nous venons de décrire nous ont permis de définir une méthode opératoire qui consiste à réaliser les cultures, sur un volume de 800 ml, dans un erlen de 1 litre. L'aération et le maintien en suspension du substrat cellulosique sont assurés simultanément par une agitation magnétique à l'aide de barreaux aimantés enrobés de téflon de 60x10 mm tournant à la vitesse de 5 tours/s, de telle sorte que le cône de dépression créé par l'agitation, ait son sommet sur le barreau magnétique.

C H A P I T R E I I I

INFLUENCE DU SUBSTRAT DE CULTURE SUR LA
PRODUCTION DE MYCELIUM ET DES CELLULASES

INTRODUCTION

Parmi les nombreux facteurs pouvant affecter les cultures, le substrat est très important. En effet, il constitue l'unique source de carbone pour le champignon qui est obligé de l'attaquer, afin d'utiliser ses produits de dégradation. De ce fait, le substrat peut jouer un grand rôle :

- par sa concentration
- par la taille de ses particules, qui peuvent être solubles ou en suspension,
- par sa composition chimique, dont les composants élémentaires et les impuretés.

Parmi ces différents facteurs, nous avons étudié :

- la comparaison entre deux cultures effectuées soit sur cellulose solubilisée, soit sur cellulose insoluble (étude effectuée sur cellulose Solka Floc).
- l'influence de la dimension des particules du substrat (étude effectuée sur rafles de maïs).
- l'influence de la concentration du substrat (étude effectuée sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs).

COMPARAISON ENTRE DEUX CULTURES EFFECTUEES SUR CEL-
LULOSE SOLUBILISEE ET SUR CELLULOSE INSOLUBLE -

I - SOLUBILISATION DE LA CELLULOSE SOLKA FLOC

A/ Introduction :

Certains auteurs utilisent comme substrats cellulosi-ques, des linters de coton, de la cellulose de bois purifiée telle que la Solka Floc, du papier filtre, mais beaucoup tra-vaillent sur des celluloses gonflées par l'acide phosphori-que, des alcali-celluloses, ou des dérivés solubles de la cel-lulose, tels que la carboxyméthyl-cellulose, estimant que le microorganisme attaque mieux les molécules solubles que les particules en suspension. C'est pourquoi, l'un de nos buts prinitifs était de cultiver T. viride sur de la cellulose so-lubilisée.

B/ Mode opératoire :

Des essais préliminaires nous ont permis d'étudier le comportement à 120°C de la cellulose Solka Floc à 25 g/l vis-à-vis de la soude à différentes concentrations, et pour une même concentration de soude, le pourcentage de cellulose so-lubilisée en fonction de sa concentration.

1) Influence de la concentration de soude sur la solu-
bilisation de la cellulose Solka Floc à 25 g/l :

a) Conditions opératoires

- erlens : 100 ml
- cellulose : 500 mg
- soude 0,4 à 4% : 20 ml
- Autoclave à 120°C
- Temps de réaction : 1 heure.

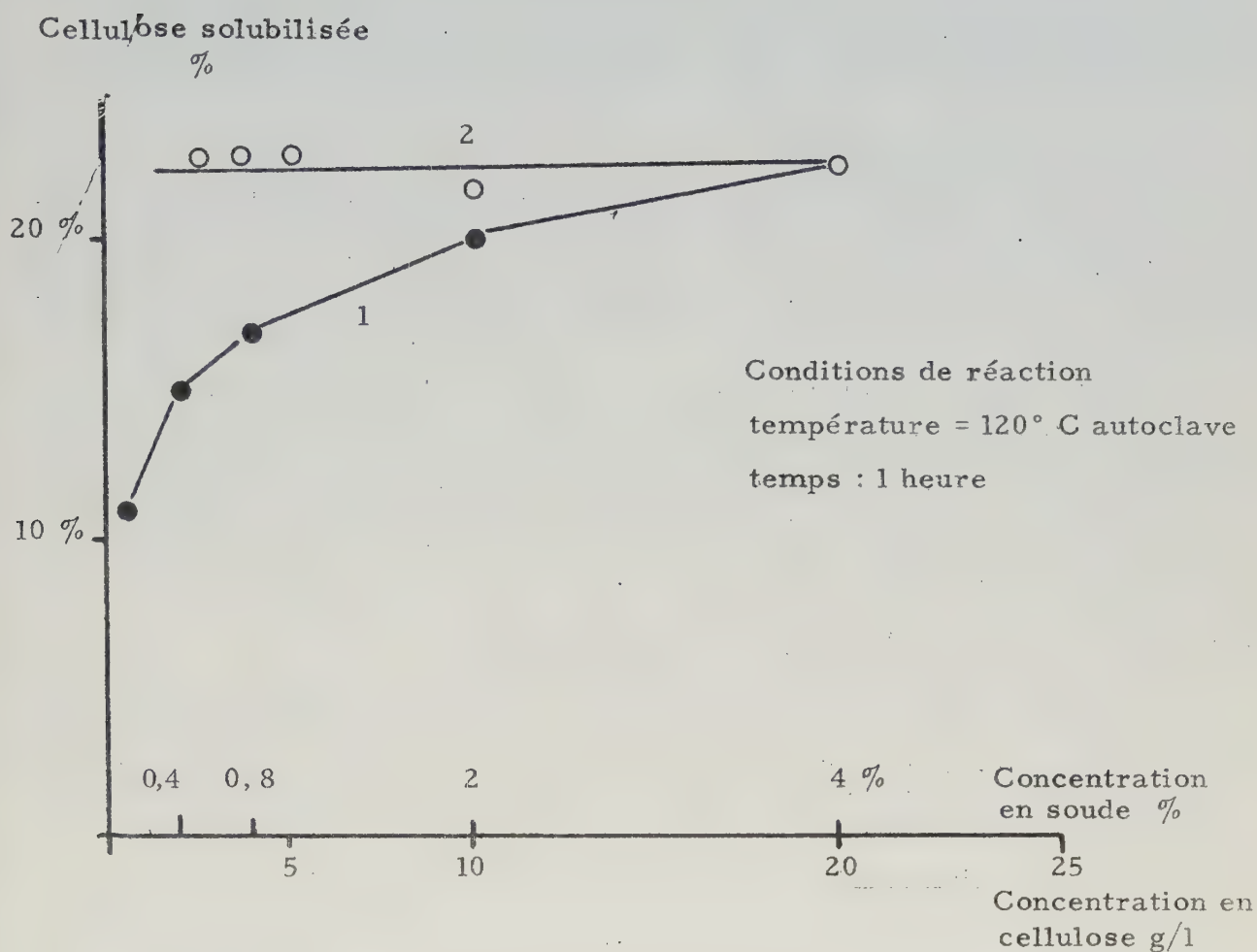
- b) Résultats : La courbe 1 du graphique 7 montre que le pourcentage de cellulose Solka Floc solubilisée, augmente rapidement pour les faibles concentrations de soude, puis tend vers un palier au-delà de la concentration 2%.

2) Influence de la concentration en cellulose Solka Floc
sur son pourcentage de solubilisation dans la soude à 4% :

a) Conditions opératoires

- erlens : 100 ml
- cellulose : 40 à 500 mg (2 à 25 g/l)
- soude : 4%

GRAPHIQUE 7



- 1 ● Influence de la concentration de soude sur le pourcentage de cellulose solubilisée (cellulose : 25 g/l)
- 2 ○ Influence de la concentration en cellulose sur son pourcentage de solubilisation (soude à 4 %)

- autoclave : 120°C
- Temps de réaction : 1 heure.

b) Résultats : La courbe 2 du graphique 7 montre que le pourcentage de cellulose solubilisée est indépendant de sa concentration, et d'une valeur de 22,5 %, ce qui indique que les quantités absolues de cellulose solubilisée augmentent avec sa concentration dans le milieu initial.

3) Conclusions

La concentration des ions sodium dans le milieu de culture de T. viride, correspond à une concentration de soude de 0,32%. En considérant le graphique 7, (courbe 1), nous remarquons que pour cette valeur, le taux de solubilisation de la cellulose est de 15% environ ; ce résultat est encore appréciable.

Ces observations nous ont permis d'effectuer une culture de T. viride sur cellulose Solka Floc solubilisée dans un mélange soude-potasse dont les concentrations correspondent à celles des ions sodium et potassium du milieu de culture de référence, d'une part,* parce que l'utilisation de soude plus concentrée n'augmente pas le degré de solubilisation de la cellulose de façon appréciable.

II - CONDITIONS DE REALISATION DES CULTURES

Les concentrations des ions sodium et potassium dans le milieu de culture de référence, sont respectivement 1847 mg/l et 125 mg/l. Nous avons donc réalisé un mélange soude-potasse de concentrations respectives : 0,32 et 0,018%, correspondant à celles des ions.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- soude : 3,2 g
- potasse: 0,18 g
- eau distillée : 1 litre
- cellulose Solka Floc : 100 g
- température 120°C à l'autoclave
- temps de réaction : 2 heures.

Après réaction, la suspension est filtrée, le résidu lavé et séché. Son poids sec étant de 80 g, la quantité de cellulose solubilisée est de 20 g. par litre.

A la solution brune obtenue, nous ajoutons les ions manquants décrits dans la composition du milieu de référence, sous forme d'acides phosphorique et nitrique concentrés, dont les quantités correspondent aux concentrations des ions phos-

* afin d'éviter par la suite des dilutions, et d'autre part,

phates et nitrates en déduisant celle du nitrate d'ammonium. Le pH est ajusté à 5,5 après addition de NH_4NO_3 : 0,6 g/l et $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,3 g/l.

100 ml de cette solution constituent la préculture, qui est incubée dix jours et dont 8 ml sont ensemencés dans un volume de culture de 800 ml, composé de la solution précédente. La culture est réalisée à 30°C dans un erlen de 1 litre, et agitée magnétiquement à l'aide d'un barreau de téflon aimanté, de 60 x 10 mm.

Des prélèvements de 10 ml sont effectués au cours du temps, sur lesquels sont réalisées les mesures des quantités de mycelium et de l'activité cellulolytique :

- mesure de la quantité de mycelium : après centrifugation du prélèvement, le culot est lavé trois fois avec dix fois son volume d'eau, séché une nuit à 100°C. Le poids du résidu sec correspond à la quantité de mycelium puisqu'aucune autre substance n'y est incluse.

- mesure de l'activité cellulolytique : le surnageant est mis en présence, soit de cellulose à 100 g/l, soit de rafles de maïs à 100 g/l, (dans ce dernier cas, nous employons le terme d'activité osidasique puisque ce substrat est constitué de divers polyosides). Les conditions opératoires sont celles que nous avons définies dans la première partie de notre étude.

Une expérience parallèle a été effectuée dans les mêmes conditions sur de la cellulose Solka Floc insoluble, à la concentration de 20 g/l.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS : Dans le tableau n°6 ci-dessous, nous avons mentionné les résultats des mesures effectuées après quatorze jours d'incubation.

: TABLEAU N°6 : Comparaison entre deux cultures de *T. viride*, : effectuées sur cellulose Solka Floc insoluble, à 20 g/l, et : sur cellulose Solka Floc solubilisée à 20 g/l. : Etude : - de la production de mycelium après quatorze jours : d'incubation, en g/l. :

: - de l'activité cellulolytique des filtrats de cul- : ture après 48 heures d'action sur de la cellulose : Solka Floc et sur rafles de maïs à 100 g/l et ex- : primée en g de glucose par litre. :

Nature du sub-	Quantité de my-	Activité cel-	Activité cel-
trat de la	celium en g/l.	lulolytique me-	lulolytique me-
culture	:	surée sur cel-	surée sur rafles
:	:	lulose Solka	de maïs.
:	:	Floc, g./glucose/l.	g./glucose/l.
: Cellulose inso-	2,1	8	17
: luble	:	:	:
: Cellulose solu-	0,6	4	10,6
: bilisée.	:	:	:

Les résultats obtenus avec la culture sur cellulose Solka Floc solubilisée sont médiocres par rapport à ceux obtenus avec la cellulose non solubilisée. Il est possible que l'attaque par la soude, en plus de la coupure des liaisons osidiques, provoque des réactions secondaires et libère à partir de la cellulose des molécules susceptibles d'inhiber la croissance du champignon.

Nos travaux ayant une orientation pratique et, par ailleurs, le prétraitement des déchets cellulosiques ne pouvant être envisagé à l'échelle industrielle, nous n'avons par la suite, utilisé que les substrats insolubles : cellulose Solka Floc et rafles de maïs, sans traitements préalables.

INFLUENCE DE LA DIMENSION DES PARTICULES DU
SUBSTRAT CELLULOSIQUE - (RAFLES DE MAIS) -

I - INTRODUCTION :

Les rafles de maïs, telles que nous les obtenons après broyage, présentent une granulométrie très hétérogène. Afin de comparer les effets de ce substrat sur le développement de T. viride, par rapport à la cellulose Solka Floc de référence, nous avons été amenés à fractionner les rafles de maïs sur une gamme de tamis AFNOR dont les numéros sont compris entre 23 et 30. L'ouverture de maille de chaque tamis est donnée dans les tableaux n°8 et n°9. Neuf fractions ont ainsi été obtenues : la fraction I est constituée des plus petites particules ayant traversé le tamis n°23 de plus faible ouverture de mailles (160 μ) ; les fractions suivantes sont constituées de particules étant restées sur les tamis intermédiaires ; la fraction 9 correspond aux rafles de maïs restées sur le tamis n°30 de plus forte ouverture de maille (800 μ). Deux séries d'expériences ont été réalisées successivement :

- étude de l'influence de la dimension des particules de rafles de maïs sur la culture de T. viride.
- étude de l'influence de la dimension des particules de rafles de maïs sur l'activité osidasique du filtrat de culture optimum, obtenu dans l'expérience précédente.

II - INFLUENCE DE LA DIMENSION DES PARTICULES DE RAFLES DE MAIS
SUR LA CULTURE DE T. VIRIDE.

A/ Conditions opératoires :

Les cultures sont réalisées sur chaque fraction de rafles de maïs obtenues après tamisage, à la concentration de 25 g/l et dans les conditions décrites à la page 19.

Après quatorze jours d'incubation des cultures, nous avons évalué :

- la production de mycelium par le dosage de l'azote total et dans quelques cas, vérifié les valeurs par dosage du tryptophane.
- l'activité cellulolytique des filtrats vis-à-vis de la cellulose Solka Floc à 100 g/l, selon les méthodes décrites au chapitre I.

B/ Résultats et discussions :

Les différents résultats obtenus figurent dans le tableau N°7 ci-après :

TABLEAU N°7 : Influence de la dimension des particules de rafles de maïs sur la culture de *T. viride*.

- Production de mycelium après 14 jours d'incubation,
- Activité cellulolytique des filtrats de culture, après 14 jours d'incubation, mesurée après 48 heures d'action sur la cellulose Solka Floc à 100 g/l.

	Ouverture	Dimension		Pourcentage		MYCE-	MYCE-	MYCE-	Activité
	ture	des		relatif de		LIUM	LIUM	LIUM	cé-
N°	de mail	raffles D	Frac-	chaque	Azote	g/l	g/l	g/l	luloly-
des	le des	en microns	tions	fraction	total	Cas le	Cas le	Dosage	tique
Tamis	Tamis			pour 100 g	chaque	plus fa-	plus dé-	du	eng de
				de rafles	fraction	vorable	favora-	Tryp-	Glucose
					%		ble.	tophane	par l.

Les quantités de mycelium et les activités cellulolytiques, obtenues après quatorze jours d'incubation, sont étroitement liées à la dimension des rafles de maïs. C'est ainsi que les rafles de maïs provenant de la fraction 1 composée des particules les plus petites, donnent les meilleurs résultats, tandis que les fractions supérieures donnent les résultats les plus médiocres. Les rafles de maïs broyées mais non tamisées, composées de particules hétérogènes correspondant à chaque fraction, donnent des résultats moyens.

Deux faits semblent être à l'origine des variations observées :

- la taille des particules du substrat,
- le taux d'azote contenu initialement dans chaque fraction,

1) Taille des particules

Plus le substrat est finement divisé, plus sa surface

de contact avec le microorganisme est élevée, d'où une meilleure croissance de *T. viride* sur les rafles de maïs composant la fraction I.

2) Taux d'azote de chaque fraction:

Il est curieux de constater que la richesse en azote est différente dans chaque fraction. En effet, plus les particules sont petites, plus le taux d'azote est élevé. La répartition de cet élément est donc hétérogène au sein de la poudre brute obtenue après broyage des rafles de maïs. Mais le fait de supposer que les fractions inférieures fournissent au champignon un apport supplémentaire en azote et favorisent la croissance du mycelium, semble en contradiction avec les remarques que nous avons faites concernant l'évaluation de la production du mycelium par les dosages parallèles d'azote total et du tryptophane :

Nous avons vu, en effet, que pour des concentrations en rafles de maïs inférieures ou égales à 25 g/l, la production de mycelium évaluée par dosage du tryptophane correspondait à celle obtenue par dosage de l'azote total, en considérant que le champignon n'utilise pas l'azote contenu initialement dans les rafles de maïs (cas le plus défavorable) (tableaux n° 1 et n° 7).

C/ Conclusions

D'après les observations que nous venons de faire, nous ne pouvons attribuer à la teneur en azote, le développement optimum de *T. viride* observé sur les rafles de maïs composant la fraction I. Néanmoins, puisque celles-ci donnent les meilleurs résultats et que la dimension des particules est proche de celle de la cellulose Solka Floc de référence, nous les avons choisies pour réaliser les expériences ultérieures.

III-INFLUENCE DE LA DIMENSION DES RAFLES DE MAÏS SUR L'ACTIVITE OSIDASIQUE D'UN FILTRAT DE CULTURE DONNE :

D'après les résultats de l'étude précédente, nous avons choisi le filtrat de culture ayant la plus haute activité cellulolytique envers la cellulose Solka Floc, que nous avons fait agir successivement sur les rafles de maïs provenant des différentes fractions du tamisage, et sur des rafles de maïs broyées mais non tamisées. Le filtrat utilisé dans cette étude provient de la culture effectuée sur les rafles de maïs de la fraction I et incubée pendant quatorze jours (dimension des particules inférieure à 160 microns).

Résultats : Le tableau n°8 ci-après, nous montre que la dimension des particules influe peu sur l'activité enzymatique du filtrat de culture de *T. viride*.

TABEAU N°8 : Influence de la dimension des rafles de maïs sur l'activité osidasique d'un filtrat provenant d'une culture de T. viride effectuée sur rafles de maïs de la fraction 1.

L'activité osidasique, exprimée en g de glucose/l, est mesurée après 48 h. d'action, sur les rafles de maïs à 100 g/l provenant des différentes fractions.

Dimension des rafles de maïs en microns	Rafles de maïs broyées non tamisées	Fraction 1 : D 160	Fraction 2 : D 200	Fraction 3 : D 250	Fraction 4 : D 315	Fraction 5 : D 400	Fraction 6 : D 500	Fraction 7 : D 630	Fraction 8 : D 630
		Tamis N°23	Tamis N°24	Tamis N°25	Tamis N°26	Tamis N°27	Tamis N°28	Tamis N°29	
Activité osidasique en g de glucose par l.	32	33,7	29,5	28,2	29,5	32,5	28,5	28,7	30,2

Les variations extrêmes observées sont de l'ordre de 15% et correspondent aux fractions 1 et 7. Dans les études comparatives que nous décrirons par la suite, afin de conserver une certaine homogénéité dans nos travaux, nous choisissons comme substrat cellulosique des réactions enzymatiques, les rafles de maïs que nous utilisons dans les cultures, c'est-à-dire celles de la fraction 1 dont la dimension des particules est proche de celle de la cellulose Solka Floc BW 200.

Remarque : Sur le plan pratique, il est intéressant de noter que les filtrats de culture libèrent, par action sur les rafles de maïs non tamisées, autant de sucres réducteurs (32 g/l) que lorsqu'ils attaquent les rafles de maïs tamisées de la fraction 1 (33,7 g/l). L'opération de tamisage peut donc ainsi être évitée, lorsque l'on veut obtenir des solutions sucrées concentrées par action des filtrats de cultures sur rafles de maïs.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION
DU SUBSTRAT CELLULOSIQUE -

I - INTRODUCTION

La cellulose en poudre d'origines diverses, ou les linters de coton, ont été utilisés selon les auteurs, à des concentrations variées dans les cultures de T. viride :

Ainsi, N. TOYAMA (86) décrit une concentration optimum de cellulose comprise entre 10 et 20 g/l,

B. NORKRANS (49) utilise 5 g/l de papier filtre moulu,

E. HANSTEIN (21) travaille sur une concentration de 30 g/l de cellulose en poudre.

GILLIGAN et REESE (16) ont étudié l'influence de la concentration en cellulose dans la culture sur l'activité carboxyméthylcellulase libérée. Les résultats figurent dans le tableau n° 9 ci-dessous :

: <u>TABIEAU N° 9</u> (16) : Influence de la concen-				
: tration en cellulose dans la culture sur				
: l'activité CMC-asioue des filtrats.				
:				
: Cellulose en g/l	:	:	:	:
: dans le milieu de	:	:	:	:
: culture	:	:	:	:
:				
: Activité CMC-asioue	:	:	:	:
: X 10 ² unités	:	:	:	:

Devant ces résultats variés, nous avons effectué une étude détaillée et comparative de cultures de T. viride sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs tamisées, dont les concentrations varient sur une grande échelle : 1 à 100 g/l.

Les mesures effectuées dans cette étude sont :

- la production de mycélium,
- le pourcentage de cellulose dégradée,
- l'activité cellulolytique ou osidasioue des filtrats de culture,
- le pH final des cultures.

II - CONDITIONS OPERATOIRES

- Plusieurs cultures sont réalisées dans les conditions décrites à la page 19,
- Nature du substrat : Cellulose SOLKA FLOC BW 200 ou rafles de maïs tamisées sur tamis AFNOR n° 23 (fraction 1).
- Concentrations du substrat : 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, et 100 g/l.
- Temps d'incubation des cultures : 14 jours.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS :

(Graphiques : 8, 9, 10)

A) Production de mycelium : (Graphique : 8)

1) Cultures sur cellulose Solka Floc :

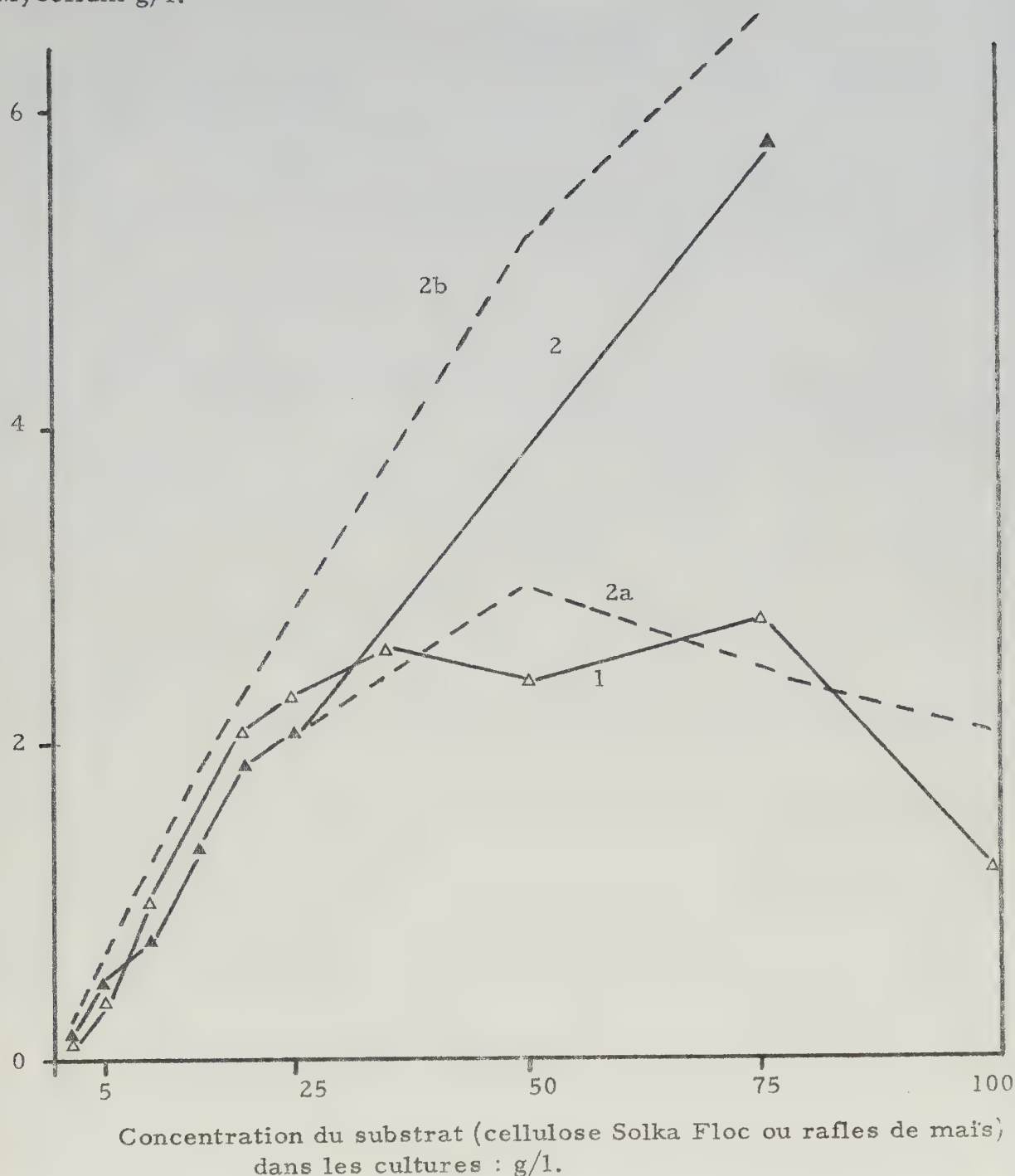
La courbe 1 du graphique 8 représentant la production de mycelium en fonction de la concentration en cellulose dans les cultures, se décompose en trois parties :

- pour des concentrations croissantes et relativement faibles en cellulose, de 1 à 20 g/l, la quantité de mycelium produite varie dans le même sens.
- pour des concentrations en cellulose, comprises entre 20 et 75 g/l, la courbe présente un palier indiquant que la production de mycelium est maximum et le nombre de cellules a atteint la saturation.
- au-delà de la concentration en cellulose de 75 g/l, nous notons une chute de production du mycelium. Ce fait peut s'expliquer par la forte densité de la suspension cellulosique présentant une viscosité élevée, de laquelle il résulte une mauvaise aération et une réduction de l'espace libre minimum, nécessaire au développement de tout organisme vivant.

Remarque : Certains auteurs utilisent des concentrations très élevées de cellulose, dans une technique dite de surface, sans agitation du milieu. Dans ce cas, le principe n'est pas le même que celui des cultures en milieu liquide.

2) Cultures sur rafles de maïs et comparaison des résultats avec ceux obtenus sur cellulose .

Nous avons vu dans le chapitre I, que la mesure de la quantité de mycelium obtenue par le dosage du tryptophane, correspond à celle déterminée par l'accroissement du taux d'azote de la masse fongiale pendant la culture (cas le plus défavorable), lorsque la concentration en rafles de maïs n'excède pas 25 g/l. Au-delà de cette valeur, la correspondance entre les deux méthodes n'existe plus et les valeurs obtenues par le dosage du tryptophane sont comprises entre



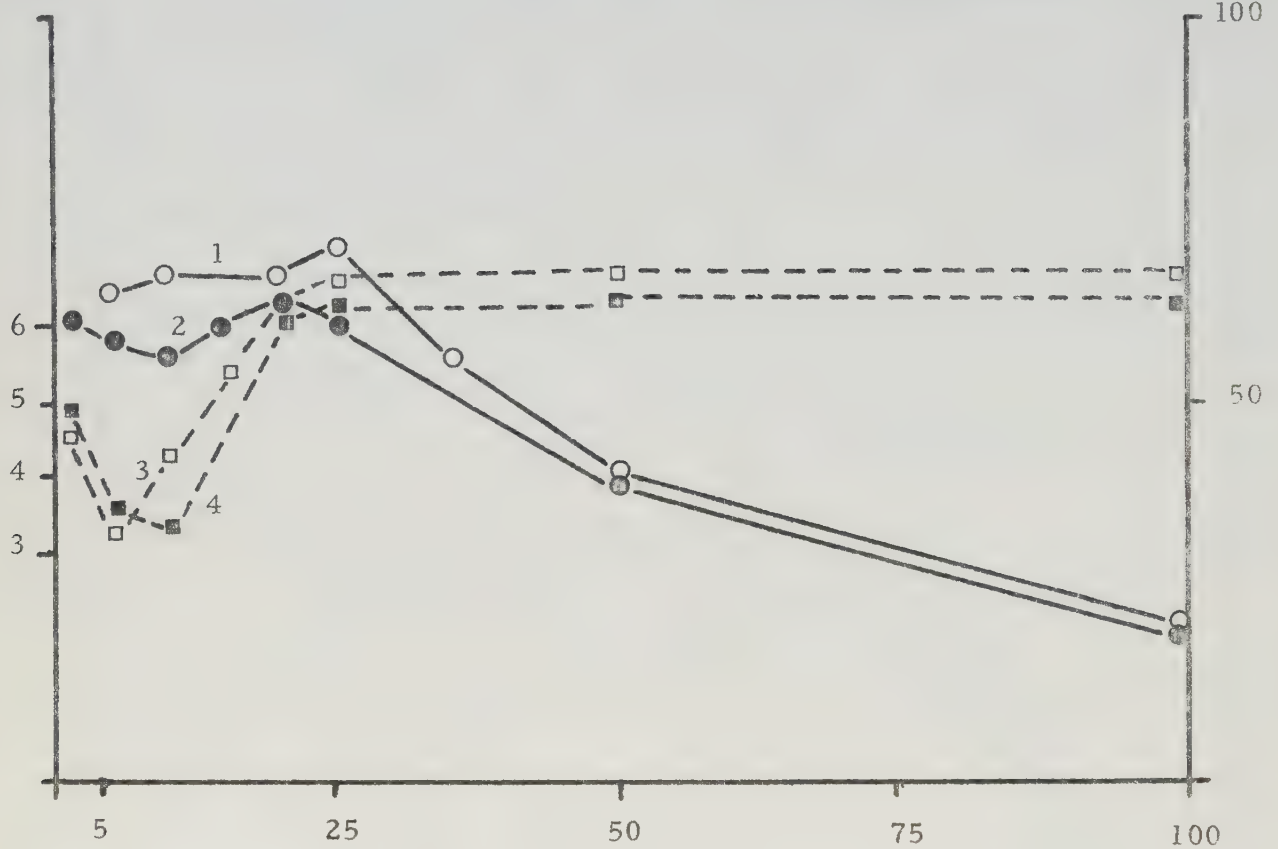
Influence de la concentration du substrat dans la culture sur la production de mycelium (g/l)

Comparaison entre les cultures effectuées sur cellulose Solka Floc (I $\triangle$ — $\triangle$) et sur rafles de maïs (2 - $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) : production de mycelium calculée par dosage du tryptophane.
2a : production du mycelium sur rafles de maïs calculée en retranchant l'azote initial des rafles de maïs (cas défavorable). 2b : production de mycelium sur rafles de maïs calculée sans retrancher l'azote initial des rafles de maïs (cas favorable).

GRAPHIQUE 9

pH final des cultures (14e jour).

Perte de poids du substrat (rafles ou cellulose) dans la culture %



Concentration en substrat (rafles de maïs ou cellulose) dans la culture g/l.

Influence de la concentration du substrat dans la culture de *T. viride* sur le pourcentage de sa dégradation et le pH du milieu en fin de croissance. Le temps d'incubation des cultures est de 14 jours.

Comparaison des études effectuées sur cellulose et rafles de maïs.

- 1 O—O Pourcentage de dégradation de la cellulose dans les cultures sur cellulose
- 2 ●—● " " des rafles de maïs dans les cultures sur rafles de maïs.
- 3 □- -□ pH final des cultures sur cellulose
- 4 ■- -■ pH final des cultures sur rafles de maïs.

celles correspondant aux deux cas extrêmes relatifs au dosage de l'azote total, selon que l'on suppose tout l'azote des rafles de maïs utilisé par T. viride (cas le plus favorable), ou que le champignon n'utilise pas cet azote (cas le plus défavorable). Sur le graphique 8, nous avons représenté les courbes relatives aux différents cas :

courbe 2 : Production réelle de mycelium (entre 1 et 25 g/l les valeurs obtenues par dosage du tryptophane et par dosage d'azote dans le cas le plus favorable, sont confondues.)

courbe 2_a : cas défavorable.

courbe 2_b : cas favorable.

Ainsi, pour des concentrations inférieures à 25 g/l, la production de mycelium, dans les cultures sur rafles de maïs, est légèrement inférieure à celle obtenue dans les cultures sur cellulose Solka Floc.

Cependant, au-delà de la concentration en substrat de 25 g/l, la production de mycelium est nettement supérieure sur rafles de maïs et croît avec la concentration de ce substrat, alors que dans les cultures sur cellulose Solka Floc, la production de mycelium atteint un palier, puis décroît au-delà de 75 g/l.

B/ POURCENTAGE DE PERTE DE POIDS DU SUBSTRAT CELLULOSIQUE :

(graphique 9, courbes 1 et 2).

Les courbes 1 et 2 du graphique 9 représentant le pourcentage de perte de poids de la cellulose Solka Floc ou des rafles de maïs, présentent un palier pour les faibles concentrations en substrats, puis une chute progressive pour les concentrations supérieures à 25 g/l. Cependant, T. Viride dégrade mieux la cellulose Solka Floc que les rafles de maïs. En prenant pour exemple la concentration de 25 g/l en substrat, nous remarquons que la perte de poids de la cellulose atteint 70 %, alors qu'elle n'est que de 60 % dans le cas de rafles de maïs. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les rafles de maïs contiennent des substances autres que les polyhosides, qui ne sont pas dégradés par T. Viride.

- Pour de fortes concentrations en substrat, la perte de poids est identique pour la cellulose Solka Floc et les rafles de maïs.
- La perte de poids de la cellulose est 3,5 fois supérieure pour la concentration de 25 g/l que pour celle de 100 g/l. Dans le cas des cultures sur rafles de maïs, ce rapport est égal à 3.

C/pH final des cultures (graphique 9, courbes 3 et 4).

Lors de certaines expériences, nous avons remarqué que l'évolution du pH pendant la culture était étroitement liée au développement de la culture. C'est pourquoi nous avons mesuré le pH final des différents essais de l'expérience que nous décrivons, ce qui nous a permis de faire plusieurs observations :

- le pH est étroitement lié à la concentration du substrat dans la culture. En effet, pour de faibles concentrations, en cellulose ou rafles de maïs, les valeurs obtenues correspondent à une acidité marquée : 3,3 pour la culture sur cellulose à 5 g/l, et 3,4 pour la culture sur rafles de maïs à 10 g/l. Le pH croît ensuite avec la concentration du substrat pour atteindre un palier de 6,3 dans les cultures sur rafles de maïs et 6,6 - 6,7 dans les cultures sur cellulose Solka Floc.

- Ces différences de pH semblent se traduire dans le cas des cultures sur cellulose, par une variation de coloration. En effet, en dessous de la concentration de 20 g/l, où le pH final est inférieur à 6, les cultures sont de couleur jaune-orangé ; pour des concentrations supérieures à 20 g/l, où l'on note que le pH final est supérieur à 6, les milieux de cultures prennent une coloration verte.

Remarque : Il n'est pas possible d'évaluer la coloration des cultures sur rafles de maïs car celles-ci provoquent une coloration brune qui s'intensifie en fonction de la concentration et masque l'évolution de la coloration due au pH.

Conclusion :

Comme nous le verrons plus loin, l'appréciation de la coloration du milieu de culture de T. viride sur cellulose Solka Floc, permet une détermination grossière de la valeur du pH.

D/Activité cellulolytique ou osidasique des filtrats de culture (graphique n°10)

Nous avons soumis de la cellulose Solka Floc et des rafles de maïs à l'action des différents substrats de cultures effectuées sur ces deux substrats, dans les conditions que nous avons déterminées plus haut (chapitre I)

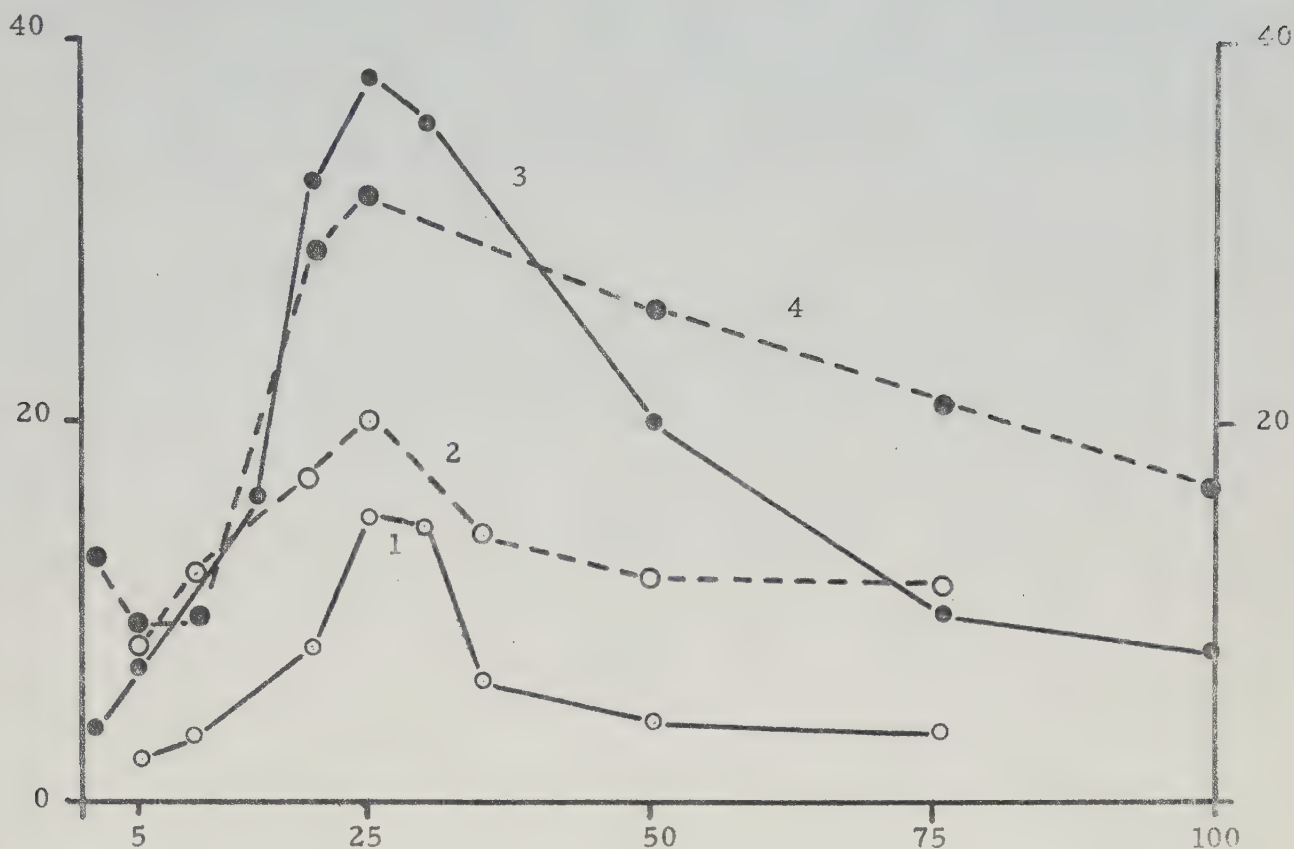
Les résultats obtenus, illustrés sur le graphique 10, nous permettent de faire plusieurs observations importantes :

1) Les courbes 1 et 3, représentant l'activité cellulolytique des filtrats de cultures envers la cellulose, présentent des maxima très nets vers la concentration de 25 g/l du substrat.

L'activité cellulolytique des filtrats de cultures dépendant de la quantité de cellulases libérées dans le milieu,

GRAPHIQUE 10

Activité cellulolytique et
osidasique des filtrats de
culture en g de glucose/l.



Concentration en substrat (rafles de maïs ou cellulose) dans les cultures
en g/l.

Influence de la concentration en substrat (rafles de maïs ou cellulose) dans la culture
T. viride, sur le pouvoir cellulolytique ou osidasique des filtrats.

Comparaison des études effectuées sur cellulose et sur rafles de maïs.

- 1 ○—○ Activité cellulolytique des filtrats de cultures sur cellulose Solka Floc, agissant sur cellulose Solka Floc à 100 g/l.
- 2 ○--○ Activité cellulolytique des filtrats de cultures sur cellulose Solka Floc, agissant sur rafles de maïs à 100 g/l.
- 3 ●—● Activité cellulolytique des filtrats de cultures sur rafles de maïs, agissant sur cellulose Solka Floc à 100 g/l.
- 4 ●--● Activité osidasique des filtrats de cultures sur rafles de maïs, agissant sur rafles de maïs à 100 g/l.

Les activités cellulolytiques ou osidasiques sont mesurées d'après le pouvoir réducteur libéré en fin de culture, sur 100 g de substrat par litre, et exprimé en g de glucose par litre.

il est possible qu'une partie de ces enzymes reste absorbée sur le substrat dans une proportion variant avec sa concentration. C'est ainsi que HALLIWELL (20) a montré que les cellulases sont adsorbées par le substrat insoluble dès leur mise en présence dans un rapport qui dépend de la concentration en cellulose et du temps de contact.

Le tableau suivant illustre ces résultats :

TABLEAU N° 10 (20)			
Adsorption des cellulases de filtrats de <i>Myrothecium verrucaria</i> par différents taux de cellulose, après 0 heure (ESO) et une heure (ESI) d'incubation.			
Cellulose (mg)	Activité enzymatique dans le filtrat en % de l'activité initiale.		
	ESO		ESI
24	2		27
12	6		28
7	16		36

Il est donc normal de penser que dans la culture même du champignon, il se produit une adsorption des cellulases, croissant avec la concentration du substrat et surtout effective à partir de 50 g/l. Le phénomène est moins marqué lorsqu'il s'agit de rafles de maïs.

obtenus

2) Les filtrats/à partir des cultures sur rafles de maïs, qu'ils soient mis en présence de cellulose ou de rafles de maïs, sont beaucoup plus actifs que les filtrats provenant des cultures sur cellulose de référence.

Considérons les cultures dont la concentration en substrat est de 25 g/l ; le filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs libère 39 g/l de sucres réducteurs évalués en glucose après action sur 100 g/l de cellulose, tandis que le filtrat provenant de la culture sur cellulose en libère 15 g/l dans les mêmes conditions. Il en est de même pour les activités mesurées après action sur rafles de maïs pour lesquelles nous trouvons 32 g/l de sucres réducteurs libérés par le filtrat de culture sur rafles de maïs et 20 g/l par le filtrat de culture sur cellulose.

Ces différences essentielles peuvent s'expliquer par le fait que les rafles de maïs contiennent des substances minérales ou organiques, dont la cellulose Solka Floc est dépourvue, stimulant la production de cellulases.

3) Les filtrats provenant des cultures sur cellulose et sur rafles de maïs, montrent des effets croisés vis-à-vis de ces deux substrats.

En effet, considérons les cultures dont la concentration en substrat est de 25 g/l. Nous remarquons que l'activité cellulolytique du filtrat de la culture effectuée sur cellulose est plus élevée en présence de rafles de maïs (courbe 1) ; inversement, le filtrat de culture sur rafles de maïs, dégrade beaucoup plus la cellulose que les rafles de maïs.

Comme nous l'avons remarqué précédemment, il est possible que les rafles de maïs, grâce à l'inclusion de substances activatrices, induisent une production plus élevée de cellulases par T. Viride.

Nous avons réalisé une chromatographie quantitative sur papier, des solutions sucrées provenant de l'attaque de la cellulose ou des rafles de maïs par le filtrat de culture effectuée sur rafles de maïs à 25 g/l.

Les résultats obtenus sont traduits en pourcentages dans le tableau n° 11 ci-dessous :

TABLEAU N°11 : Nature et pourcentage des sucres réducteurs :				
libérés après attaque de la cellulose ou des rafles de maïs à 100 g/l, par le filtrat de la culture effectuée sur rafles de maïs à 25 g/l. (Les résultats tiennent compte des sucres réducteurs libérés dans le milieu pendant la culture, et présents avant les réactions enzymatiques.)				
	Sucres ré-			
	ducteurs	GLUCOSE	CELLOBIOSE	XYLOSE
	globaux en :	%	%	%
	g de glucose			
	se / l.			
Attaque de la	42	78-80	12-14	6-8
Cellulose				
Attaque des ra-				
fles de maïs	35	75-80	traces	25

- L'attaque de la cellulose par le filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs, libère surtout du glucose et du cellobiose. En effet, le xylose obtenu provient en grande partie de la dégradation des rafles de maïs pendant la culture. D'autre part, la cellulose Solka Floc ne contient que 2,6 % de pentosanes.

- L'attaque des rafles de maïs par le même filtrat, libère surtout du glucose et du xylose.

L'ensemble de ces observations nous permettent de faire les suggestions suivantes :

a) - l'activité cellulolytique des filtrats provenant des cultures sur cellulose Solka Floc, plus élevée en présence des rafles de maïs, qu'en présence de cellulose Solka Floc, permet de soutenir l'hypothèse que le substrat naturel contient des substances activatrices, stimulant l'action des cellulases pendant la réaction enzymatique.

b) - le fait que l'attaque des rafles de maïs par le filtrat provenant de la culture sur rafles de maïs à 25 g/l ne produit pas de cellobiose indique la présence de cellobiases, libérées pendant la culture. Cependant, lors de l'attaque de la cellulose Solka Floc, par le même filtrat, une quantité importante de cellobiose est libérée semblant indiquer que, dans ce cas, les cellobiases ne sont pas actives. En effet, le pH optimum d'action des cellobiases est situé vers 4 (84). Comme nous effectuons les réactions enzymatiques à pH 5, il apparaît donc que les cellobiases ne peuvent agir pendant l'attaque enzymatique de la cellulose Solka Floc. De ce fait, les rafles de maïs doivent contenir des substances stimulant l'action des cellobiases puisque le cellobiose n'apparaît pas lors de l'attaque des rafles de maïs par le filtrat.

D'autre part, les rafles de maïs contenant des xylanes, induisent la production de xylanases par T. Viride, libérant du xylose pendant la culture même, et pendant l'attaque enzymatique des rafles de maïs par le filtrat de culture.

c) - Bien que les rafles de maïs induisent la production de nombreux enzymes, spécifiques des composés organiques divers qu'elles contiennent, le filtrat provenant de la culture effectuée sur ce substrat, est plus actif sur la cellulose Solka Floc. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le taux de cellulose est beaucoup moins élevé dans les rafles de maïs que dans le substrat de référence qui en contient 94%, et qu'à pH 5, ce sont surtout les cellulases qui sont actives (l'action possible des cellobiases et xylanases, observée dans l'attaque enzymatique des rafles de maïs, ne pouvant compenser la production de sucres réducteurs libérés par l'action des cellulases sur la cellulose Solka Floc.

CONCLUSIONS

Les expériences que nous avons décrites dans ce chapitre nous ont permis :

- de montrer que la cellulose Solka Floc insoluble, est mieux dégradée par T. Viride que lorsqu'elle est solubilisée dans les conditions que nous avons décrites.

- de déterminer la dimension des rafles de maïs la plus favorable : les résultats optimum sont obtenus avec les rafles de maïs dont la grosseur des grains est de même ordre que celle de la cellulose Solka Floc.

- de montrer que la concentration optimum du substrat est située sur une échelle très restreinte, entre 20 et 30 g/l.

- d'observer des différences très importantes dans l'activité cellulolytique des filtrats, en faveur des cultures effectuées sur rafles de maïs.

En conséquence, de nouvelles constantes apparaissent pour la réalisation des cultures de T. Viride :

- la nature du substrat cellulosique, que l'on choisit insoluble.

- Sa concentration dans les cultures, que nous fixons à 25 g/l.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA PRECULTURE
SUR LA PRODUCTION DE MYCELIUM, LA DEGRADATION
DU SUBSTRAT ET L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE.

Nous avons vu plus haut que le but de la préculture était d'adapter le microorganisme au substrat et de réduire le temps de latence relatif à sa croissance. Le fait de modifier certaines conditions de réalisation de la préculture est donc susceptible d'affecter les cultures. C'est pourquoi, en conservant les conditions opératoires décrites à la page 17, nous avons modifié successivement :

- la nature du substrat de la préculture,
- le volume d'ensemencement de la culture,
- l'âge de la préculture.

INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT DE LA PRECULTURE

I - CONDITIONS OPERATOIRES

Trois précultures, de substrat différent, ont été effectuées :

- préculture A, substrat : cellulose Solka Floc 10 g/l
- préculture B, substrat : cellobiose : 10 g/l
- préculture C, substrat : glucose : 10 g/l

Les différentes cultures, réalisées sur cellulose Solka Floc à 25 g/l, sont les suivantes :

Essai 1 : ensemencé avec 8 ml de la préculture A

Essai 2 : " " " " B

Essai 3 : " " " " C

Les conditions de culture et de préculture sont celles décrites à la page 19. Les mesures de la production en mycelium et de l'activité cellulolytique des filtrats sont effectuées après 14 jours d'incubation.

II - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Nous n'avons pu obtenir de résultats reproductibles en ce qui concerne l'essai 3 ensemencé avec la préculture sur glucose, car nous avons observé selon les expériences, soit une activation, soit une inhibition par rapport à l'essai 1 ensemencé avec la préculture sur cellulose. Cependant, dans tous les cas nous avons pu montrer une activation dans l'essai 2, ensemencé avec la préculture sur cellobiose, par rapport au témoin (essai 1), comme l'indique le tableau n°12 ci-dessous.

TABLEAU n° 12 : Influence du substrat de la préculture sur la culture de <u>T. viride</u> sur cellulose Solka Floc à 25 g/l.				
substrat de la préculture	essai	azote du mycelium au temps 14 jours en mg/l	Mycelium au temps 14 jours en g/l	Activité cellulolytique des filtrats en g de glucose/l.
A cellulose	1	264	2,2	14
B cellobiose	2	312	2,6	18

Les valeurs décrites dans ce tableau reflètent les cinétiques des cultures que nous n'avons pas mentionnées : vitesse de croissance du mycelium et vitesse d'apparition de l'activité cellulolytique.

Les différences observées peuvent s'expliquer ainsi :

Lorsqu'il est ensemencé dans l'essai 1, T. viride possède des cellulases qui agissent lentement sur la cellulose en libérant du cellobiose, qui induit alors la production de cellobiase. Lorsqu'il est ensemencé dans l'essai 2, le champignon met un certain temps à synthétiser les cellulases qu'il n'a pas, mais il est déjà adapté au cellobiose qu'il dégrade rapidement.

Ces observations semblent suggérer que l'induction des cellulases est plus rapide que celle des cellobiases.

Remarque : Nous avons fait une étude comparée entre deux cultures de T. viride sur rafles de maïs, dont l'une est ensemencée avec une préculture sur cellulose à 10 g/l, et la seconde avec une préculture effectuée sur rafles de maïs à 10 g/l dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats obtenus apparaissent en faveur de la préculture réalisée sur cellulose, comme le montre le tableau n°13 suivant :

TABEAU N° 13 : Comparaison entre deux cultures de T. viride sur rafles de maïs ensemencées respectivement avec une préculture sur cellulose et une préculture sur rafles de maïs.

préculture substrat en g/l	culture substrat en g/l	Poids sec total rési- duel sur g/l après 14 jours de culture	Mycelium g/l après 14 jours de culture	% de subs- trat disparu	Activité celluloly- tique des filtrats mesurée à 14 jours sur cellulose à 100 g/l g glucose/l
SOLKA FLOC : rafles de 10 g/l	rafles de : maïs 25g/l :	12,533 :	2,030 :	58 :	37,3 :
Rafles de : maïs 10g/l :	rafles de : maïs 25g/l :	13,525 :	1,775 :	53 :	28,9 :

La préculture sur cellulose semble donner une meilleure induction de la dégradation des rafles de maïs par T. viride, que la préculture effectuée sur ce dernier substrat. L'activité cellulolytique libérée est de ce fait supérieure dans le cas de la culture ensemencée avec la préculture effectuée sur cellulose.

III - CONCLUSIONS : Nous avons vu que le cellobiose induit mieux les cellulases que la cellulose même, cependant notre but étant d'intérêt pratique, nous avons préféré choisir la cellulose SOLKA FLOC pour la culture et la préculture de T. viride, afin de conserver une homogénéité dans nos travaux. Pour les mêmes raisons nous avons choisi, pour la réalisation des cultures sur rafles de maïs, d'effectuer les précultures sur la cellulose SOLKA FLOC à 10 g/l.

INFLUENCE DU VOLUME D'ENSEMENCEMENT DE LA CULTURE

La réduction du temps de croissance de T. viride étant l'une de nos intentions, nous avons pensé que le fait d'ensemencer les cultures avec des volumes de précultures plus importants influencerait dans ce sens.

I - CONDITIONS OPERATOIRES

Les expériences qui suivent ont été réalisées sur des cultures effectuées sur cellulose SOLKA FLOC à 25 g/l, dans lesquelles les conditions opératoires sont celles que nous avons décrites page 18.

Le facteur variable est le volume de préculture ensemencé.

Essai 1 : témoin : culture ensemencée avec 8 ml de la préculture, soit 1 %.

Essai 2 : culture ensemencée avec 12 ml de la préculture soit 1,5 %.

Essai 3 : culture ensemencée " 16ml de la préculture, soit 2 %

Essai 4 : " " " 40ml " " " 5%

Essai 5 : " " " 80ml " " " 10%

Remarques : Afin d'avoir une quantité suffisante de préculture, celle-ci a été effectuée sur un volume de 150 ml dans un erlen de 250 ml. D'autre part, dans chaque culture, le volume de la solution minérale est modifié de telle sorte qu'après ensemencement de la préculture, le volume final soit de 800ml.

II - RESULTATS : (graphique 11)

Les variations observées ne sont pas dans le sens que l'on attendait. En effet, non seulement la vitesse de croissance est optimum dans l'essai 1 (témoin), ensemencé à 1 %, mais encore le rendement final en mycelium est supérieur à celui des autres essais.

Les résultats sont identiques en ce qui concerne l'activité cellulolytique des filtrats.

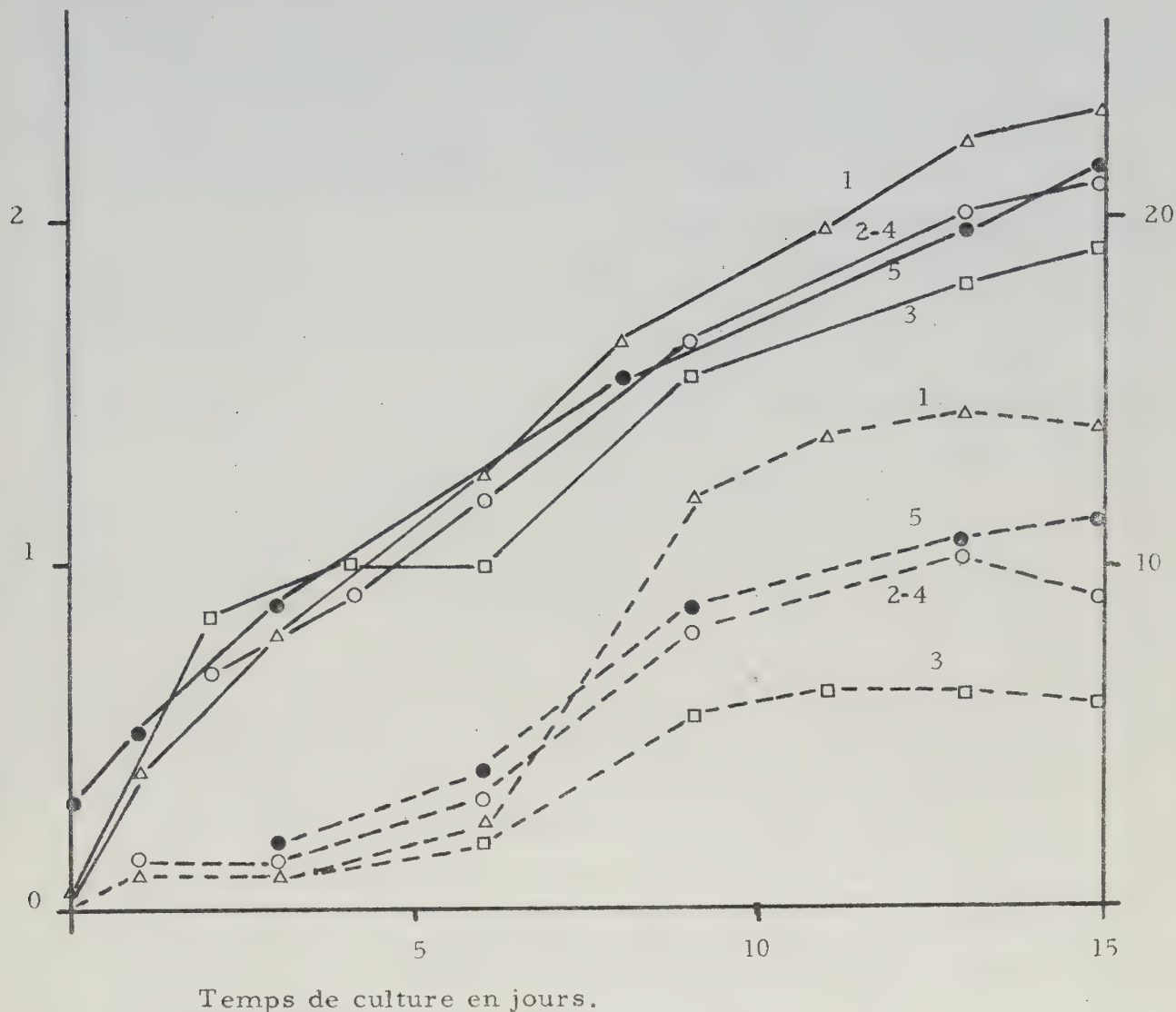
III - CONCLUSION :

L'ensemencement des cultures à 1% semble être le plus favorable au développement de T. viride. Il est possible qu'en fin de croissance le champignon secrète des substances toxiques et inhibitrices, dont l'effet augmente avec le volume de préculture ensemencé. C'est pourquoi nous avons conservé un ensemencement de 1 % pour la suite de nos travaux.

GRAPHIQUE 11

Activité cellulolytique des
filtrats de cultures g de
glucose/l.

Quantité de mycelium
en g/l



Influence du volume de préculture ensemencé dans la culture de *T. viride* sur cellulose Solka Floc à 25 g/l. Volume des cultures : 800 ml.

En traits continus : cinétique de croissance du mycelium en g/l.

En traits discontinus : cinétique de l'activité cellulolytique des filtrats de cultures mesurée d'après le pouvoir réducteur libéré exprimé en g de glucose/l.

I	Δ	Culture ensemencée avec	8 ml de préculture soit :	1 % (témoin)
2-4	○	" "	12,5 et 40 ml "	1,5 et 5 %
3	□	" "	16 "	2
5	●	" "	80 "	10

Les courbes 2 et 4 sont pratiquement confondues.

INFLUENCE DE L'AGE DE LA PRECULTURE

I - INTRODUCTION : Au cours de diverses expériences où les mêmes facteurs étaient conservés, excepté le temps d'incubation de préculture, nous avons observé des variations qui étaient susceptibles de lui être attribuées. C'est pourquoi nous avons effectué une étude systématique de l'influence de l'âge de la préculture sur la croissance de T. viride et l'activité cellulolytique des filtrats, par des mesures cinétiques.

II - CONDITIONS OPERATOIRES

Les conditions de culture ayant été définies plus haut, différents essais sont ensemencés avec 8 ml d'une préculture sur cellulose, prélevée à des temps d'incubation différents compris entre 2 et 15 jours.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS (graphiques : 12, 13, 14, 15).

A/ Croissance du mycelium (graphiques 12 - 13)

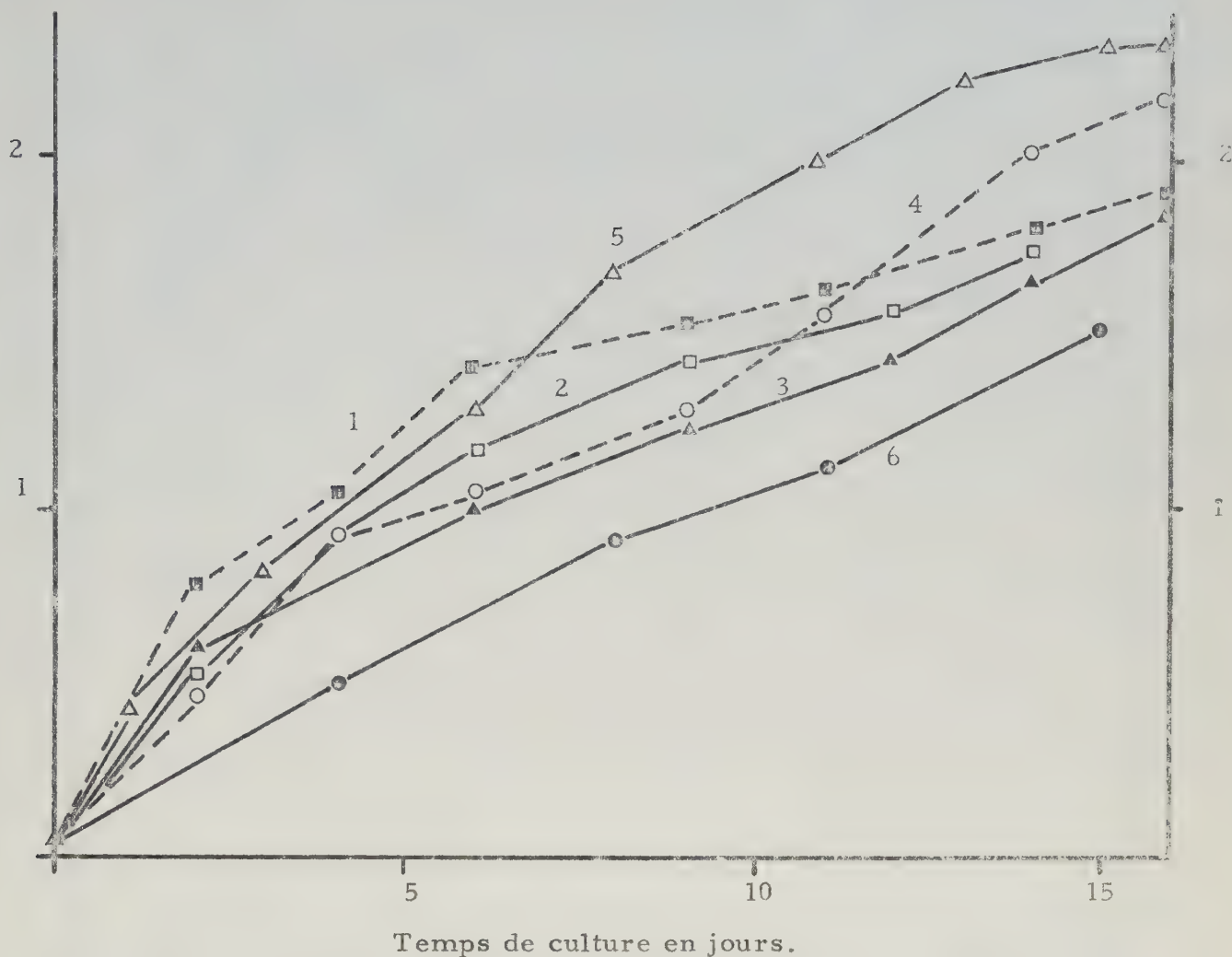
La croissance optimum correspond à l'essai 5, ensemencé avec la préculture âgée de 12 jours. Sur le graphique 13 donnant la quantité de mycelium au 15ème jour en fonction de l'âge de la préculture, nous remarquons que le maximum se situe entre 9 et 12 jours d'incubation.

Nous avons étudié, d'autre part, la vitesse initiale de croissance du mycelium, dans chaque essai, correspondant aux quatre premiers jours de culture. Le tableau n°14 ci-dessous et le graphique 13, nous montrent l'existence de deux maxima correspondant aux essais 1 et 5 ensemencés avec la préculture âgée respectivement de 2 et 12 jours.

TABLEAU N° 14 : Vitesse de croissance initiale, pendant les 4 premiers jours, de cultures ensemencées avec des précultures d'âge différent.						
Age de la préculture en jours	Cultures : essai n°	Mycelium en mg/l : au temps 0 Mo	Mycelium en mg/l : au temps 4 M ₄	Vitesse initiale approchée : mesurée sur les 4 premiers jours	M ₄ - Mo 4 en mg/jours	
2	1	20	1040		258	
4	2	"	900		225	
6	3	"	900		225	
9	4	"	900		225	
12	5	"	960		240	
15	6	"	500		125	

GRAPHIQUE 12

Mycelium en g/l



Influence de l'âge de la préculture sur la culture de *T. viride*.
Cinétique de croissance du mycelium en g/l.

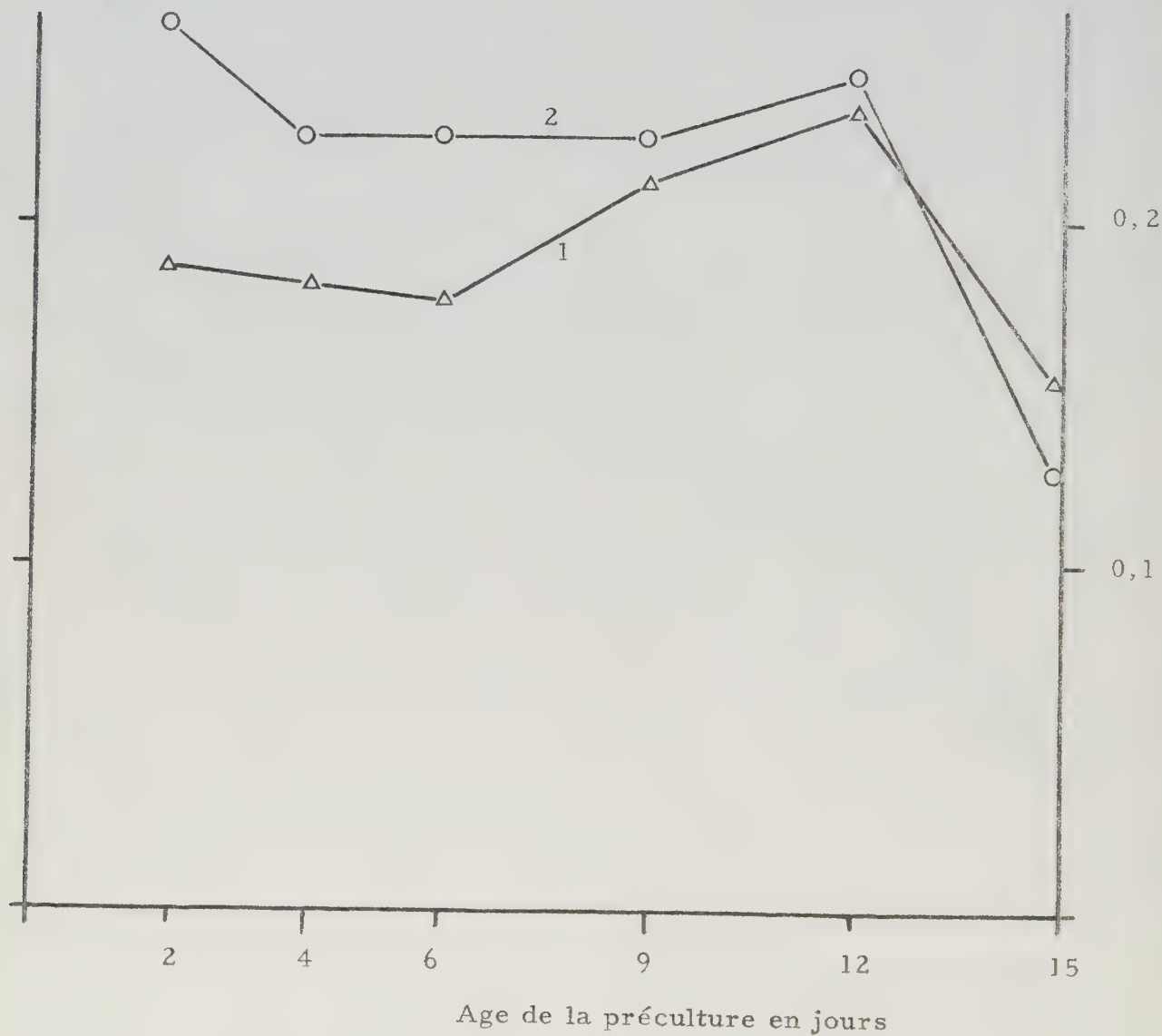
1	■—■	Cultureensemencée avec une préculture âgée de	2 jours	
2	□—□	"	"	"
3	▲—▲	"	"	"
4	○—○	"	"	"
5	△—△	"	"	"
6	●—●	"	"	"
				(témoin)

Concentration en cellulose dans la culture : 25 g/l

GRAPHIQUE 13

Taux de mycelium en fin
de croissance (15 jours)
g/l

Vitesse de croissance initiale
Rendement journalier pendant
les 4 premiers jours g/jour.



Influence de l'âge de la préculture sur le taux de mycelium produit après 15 jours de culture et sur la vitesse initiale de croissance.

- 1 $\Delta-\Delta$ Taux de mycelium en g/l produit après 15 jours de culture
- 2 $O-O$ Rendement journalier en mycelium pendant les 4 premiers jours en g/jour ou vitesse initiale de croissance du mycelium.

Les résultats obtenus peuvent s'expliquer ainsi :

- Lorsqu'on ensemence une culture avec une préculture âgée de 2 jours, le champignon se trouve sous forme de filaments qui se multiplient très rapidement dans le milieu neuf. Lorsque la préculture est âgée de 4 à 6 jours, des spores apparaissent, mettant un certain temps à se développer dans la culture, d'où la chute observée dans la vitesse initiale de croissance. Lorsque le temps d'incubation de la préculture atteint 9 - 12 jours, la masse fongique est plus importante, contenant plus de spores, mais aussi beaucoup plus de filaments qu'à 2 ou 4 jours. Ces derniers se multiplient très rapidement en masquant le temps de latence dû aux spores. C'est pourquoi, nous observons un accroissement de la vitesse initiale à ce stade. Après 15 jours d'incubation, la préculture est constituée dans sa presque totalité, par des spores qui se développent très lentement lorsqu'ils sont ensemencés dans le milieu neuf (courbe 6, graphique n°12). C'est ainsi qu'après 12 jours de préculture, la vitesse initiale de croissance de la culture décroît rapidement.

Remarque : Nous n'avons pas effectué de mesures au-delà de 16 jours, mais il est probable que toutes les cultures atteignent le même palier que celui de la culture 5 (témoin).

B/ Activité cellulolytique des filtrats : (graphique n° 14)

Comme dans le cas de la production de mycelium, l'évolution de l'activité cellulolytique des filtrats de culture est optimum pour l'essai n°5, ensemencé avec la préculture âgée de 12 jours.

C/ pH des cultures (graphique n° 15)

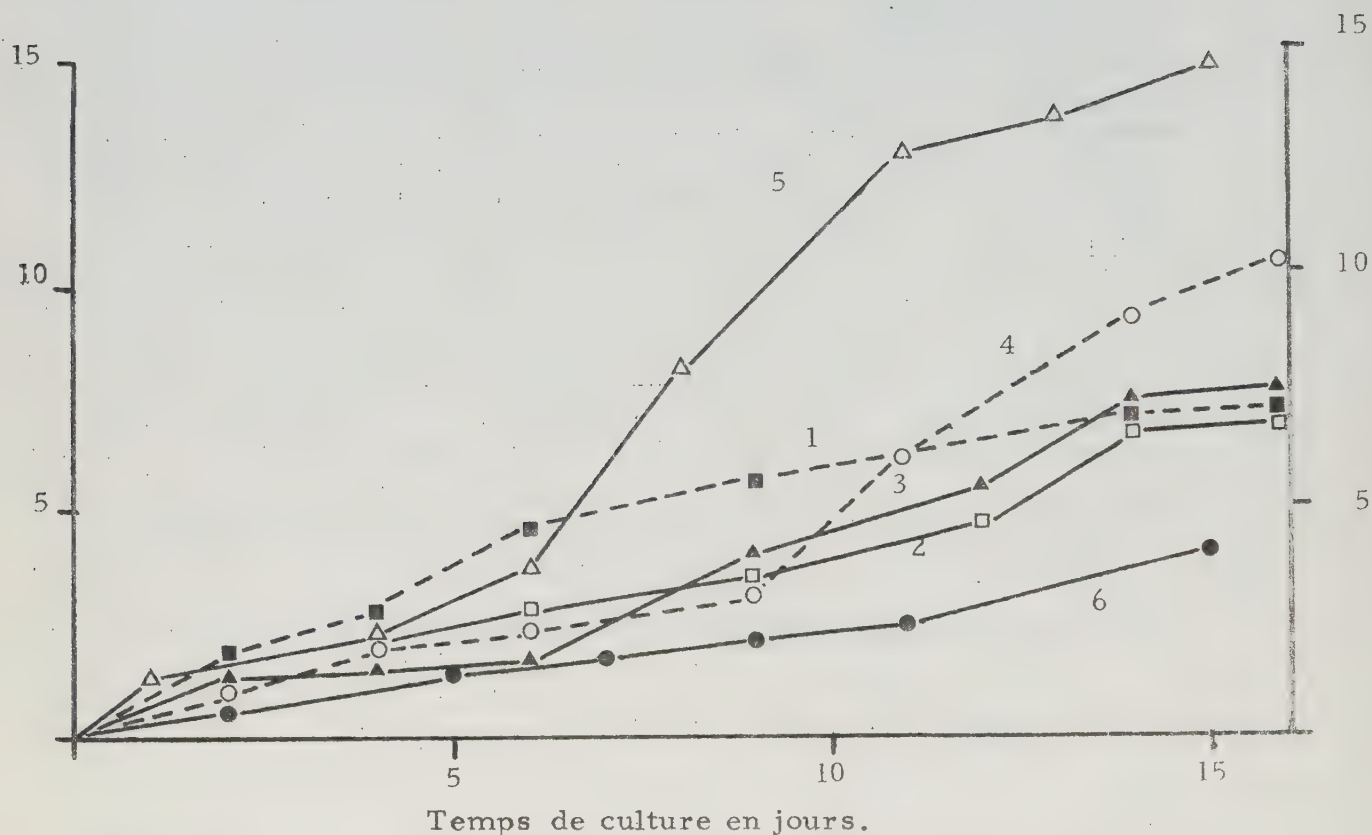
Le graphique n° 15 montre que la croissance du mycelium et l'activité cellulolytique sont étroitement liées aux variations de pH du milieu de culture. En effet : plus le palier du pH (6,6) est atteint rapidement, plus la vitesse finale de croissance est grande et meilleurs sont le taux de mycelium et l'activité cellulolytique. Ainsi le pH de l'essai 5, ensemencé avec la préculture âgée de 12 jours, atteignant le premier le palier 6,6 de fin de culture, la croissance et l'activité cellulolytique sont optimum, tandis que le pH de l'essai 6 (préculture âgée de 15 jours), évoluant très lentement vers le palier, nous observons une croissance ralentie (graphique 12, courbe 6).

D/ Conclusions

Le taux de mycelium et l'activité cellulolytique maximum correspondant à un temps d'incubation de la préculture compris entre 9 et 12 jours, nous avons choisi, pour l'ensemencement de nos cultures ultérieures, un temps de préculture de 11 jours.

GRAPHIQUE 14

Activité cellulolytique des
filtrats en g de glucose/l.



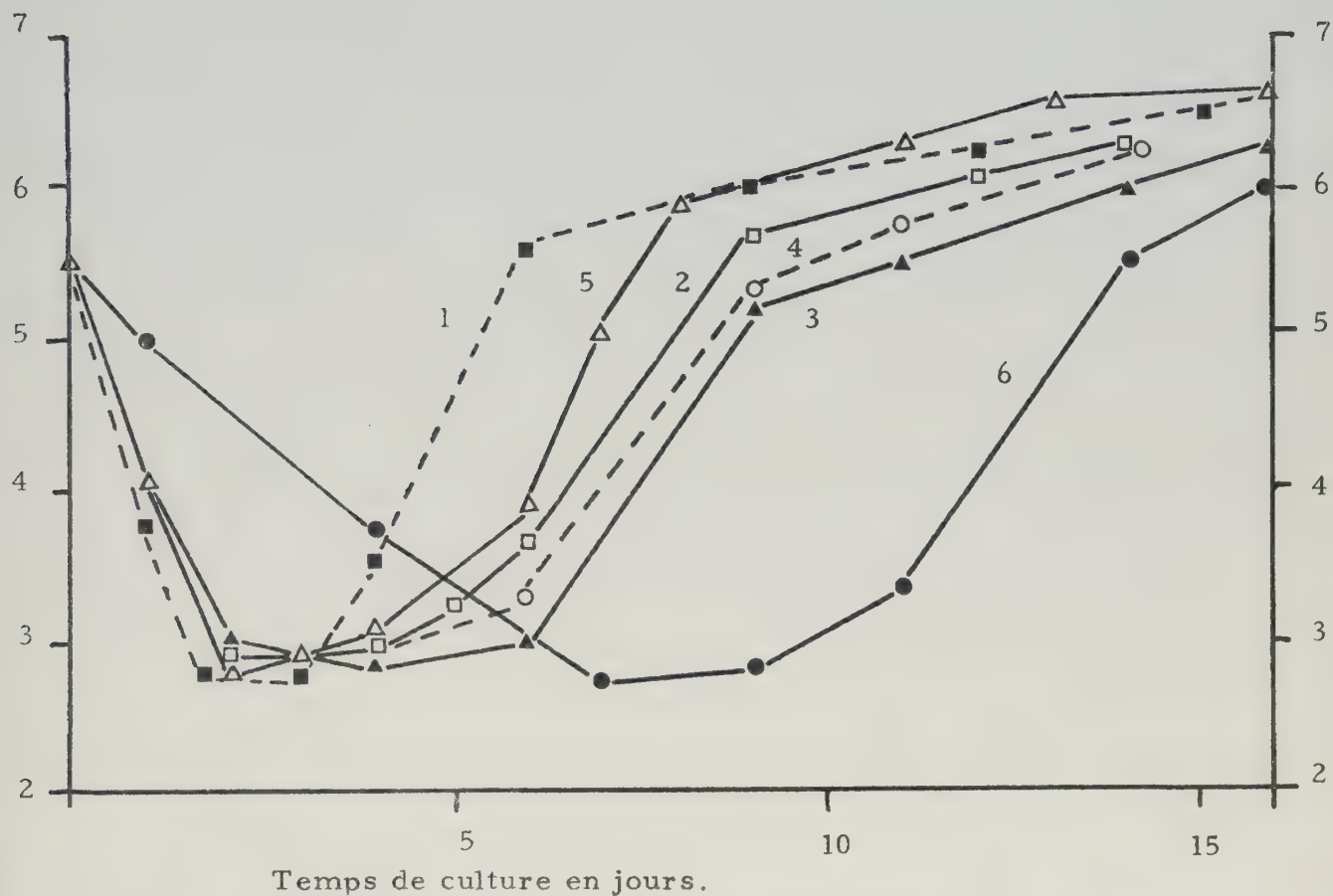
Influence de l'âge de la préculture sur la culture de T. viride . Cinétique de l'activité cellulolytique des filtrats de cultures, mesurée d'après le pouvoir réducteur global libéré exprimé en g de glucose/ l.

1	■--■	Culture ensemencée avec une préculture âgée de	2 jours
2	□--□	" "	4 "
3	▲--▲	" "	6 "
4	○--○	" "	9 "
5	△--△	" "	12 "
6	●--●	" "	15 "

Concentration en cellulose dans la culture : 25 g/l.

GRAPHIQUE 15

pH des cultures en
cours de croissance



Influence de l'âge de la préculture sur la culture de T. viride

Cinétique du pH des cultures

1	■--■	Culture ensemencée avec une préculture âgée de	2 jours
2	□—□	"	"
3	▲—▲	"	"
4	○--○	"	"
5	△—△	"	"
6	●—●	"	"

C H A P I T R E V

INFLUENCE DES IONS MINERAUX ET DU pH
SUR LA PRODUCTION DU MYCELIUM ET DES CELLULASES,
ET SUR LA DEGRADATION DU SUBSTRAT.

INTRODUCTION

De nombreux auteurs (21), (81) ont étudié l'influence du pH initial, sur la croissance de T. viride dans un milieu liquide hétérogène contenant en suspension un substrat cellulosique, mais il semble qu'aucun d'eux ne se soit intéressé à l'évolution du pH pendant l'incubation de la culture.

Au cours de nos expériences, nous avons noté des variations du pH pendant les cultures, susceptibles d'influencer le développement de T. viride et la production de ses cellulases (chapitre IV). D'autre part, dans certains cas, nous avons remarqué des anomalies concernant la coloration du milieu de culture. En effet, : lorsqu'une culture effectuée sur cellulose Solka Floc évolue normalement, la coloration du milieu devient verte en fin de croissance, alors que dans certaines expériences, les cultures prenaient une coloration orangée. En fait, après mesure du pH et évaluation de la quantité de mycelium en fin d'incubation, il nous est apparu que la coloration orangée correspondait à un pH de 2,7-2,8 et à une inhibition de la croissance de mycelium (0,8 g/l), tandis que les cultures normales dans lesquelles le pH final est de 6,6-6,7 et la coloration du milieu verte, la production de mycelium est de 2,3 g/l.

Ces observations nous ont amenés à effectuer pendant les cultures, des mesures cinétiques du pH, qui nous ont permis de découvrir les causes de son évolution et de définir une nouvelle orientation dans nos recherches.

MESURES CINETIQUES DE LA CROISSANCE
DU MYCELIUM, DE LA PRODUCTION DE CELLULASES ET DE
LA DEGRADATION DU SUBSTRAT - ET RELATIONS AVEC LA
CONSUMMATION DES IONS ET L'EVOLUTION DU pH AU COURS
DE LA CULTURE.

I - CONDITIONS OPERATOIRES :

Avant de commencer notre étude, nous rappelons les conditions opératoires utilisées pour la réalisation des cultures sur le milieu minéral témoin, en fonction des résultats obtenus antérieurement.

- nature du substrat : cellulose Solka Floc ou rafles de naïs,
- concentration du substrat : 25 g/l
- volume de solution minérale de référence à pH 5,5 : 800 ml,
- volume des erlens de cultures : 1 litre,
- agitation magnétique : 5 tours/s
- barreau aimanté en téflon : 60 x 10 mm
- volume d'ensemencement : 8 ml de préculture
- température d'incubation : 30°C
- temps d'incubation : facteur variable permettant les mesures cinétiques.

Conditions de préculture :

- nature du substrat : cellulose Solka Floc
- concentration du substrat : 10 g/l
- volume de solution minérale à pH 5,5 : 100 ml
- erlen de préculture : 250 ml
- autolysat de levure : 10 mg
- agitation magnétique : 3 tours/s
- barreau aimanté enrobé de téflon : 40 x 8 mm
- température d'incubation : 30°C
- temps d'incubation : 11 jours
- ensemencement : à partir d'un tube de gélose glucosée.

Les mesures effectuées dans cette étude, sont :

- l'évolution du pH dans les cultures sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs,
- la croissance du mycelium dans les cultures sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs,
- la consommation des ions dans les cultures sur cellulose Solka Floc,
- la production de cellulases dans les cultures sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs.

II - CINETIQUE DE PRODUCTION DU MYCELIUM ET RELATION AVEC L'EVOLUTION DU pH AU COURS DE LA CULTURE (Graphiques 16 - 17).

Etude comparée des cultures sur cellulose et sur rafles de maïs (graphique 16).

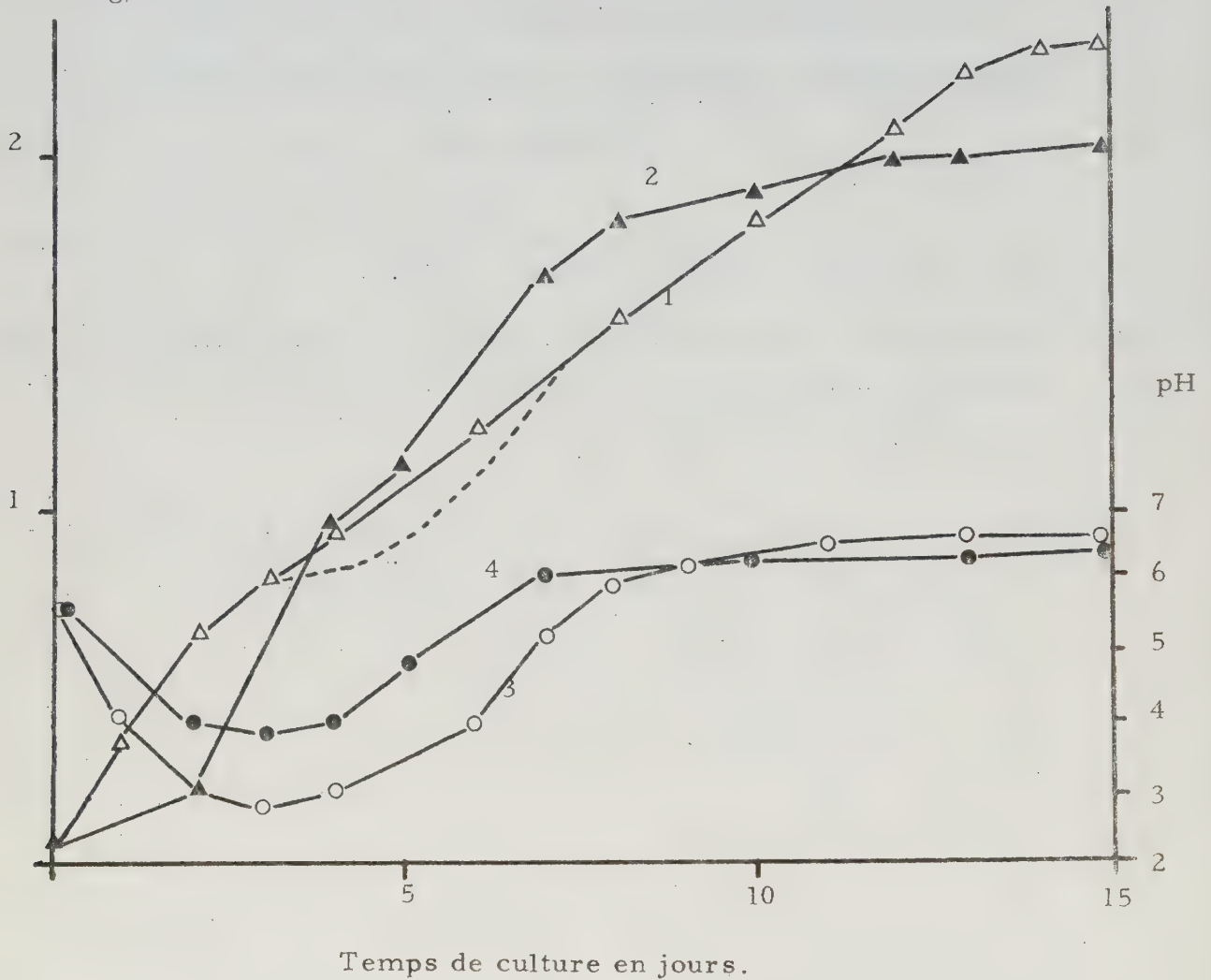
Les courbes 1 et 2 représentant les quantités de mycelium en fonction du temps d'incubation, ont l'aspect général de courbes normales de croissance. Le temps de latence est très réduit dans la culture sur cellulose par rapport à la période de croissance ; il est plus marqué dans la culture sur rafles de maïs. Cependant, après le deuxième jour, la vitesse de croissance est plus élevée dans cette culture puisque la courbe correspondante chevauche celle relative à la culture sur cellulose. Le palier de croissance est atteint plus rapidement dans la culture sur rafles de maïs (10ème jour) que dans la culture sur cellulose (14ème jour), mais la valeur du palier est en faveur de cette dernière : 2,3 g/l de mycelium contre 2,0 g/l pour la culture sur rafles de maïs. En faisant la moyenne d'une dizaine d'expériences réalisées sur des cultures de T. viride sur la cellulose Solka Floc, nous avons remarqué que la production de mycelium à un instant donné, était constante et liée au pH de la culture, mesuré au moment du prélèvement. En effet, si nous considérons la courbe 3 du graphique 16, nous remarquons que le pH subit des modifications pendant le développement de la culture :

- durant les quatre premiers jours, il s'acidifie en passant de la valeur 5,5 (temps 0) à 2,7 - 2,8 (temps 3 jours),
- entre le 4ème et le 8ème jour, il subit une remontée rapide jusqu'à la valeur 5 - 5,1,
- au-delà du 8ème jour, il tend lentement vers la neutralité (pH 6,6 - 6,7).

Comme nous l'avons vu antérieurement, (chapitre III), la coloration du milieu de culture est liée au pH de la culture. Ce phénomène est observé de la manière suivante :

GRAPHIQUE 16

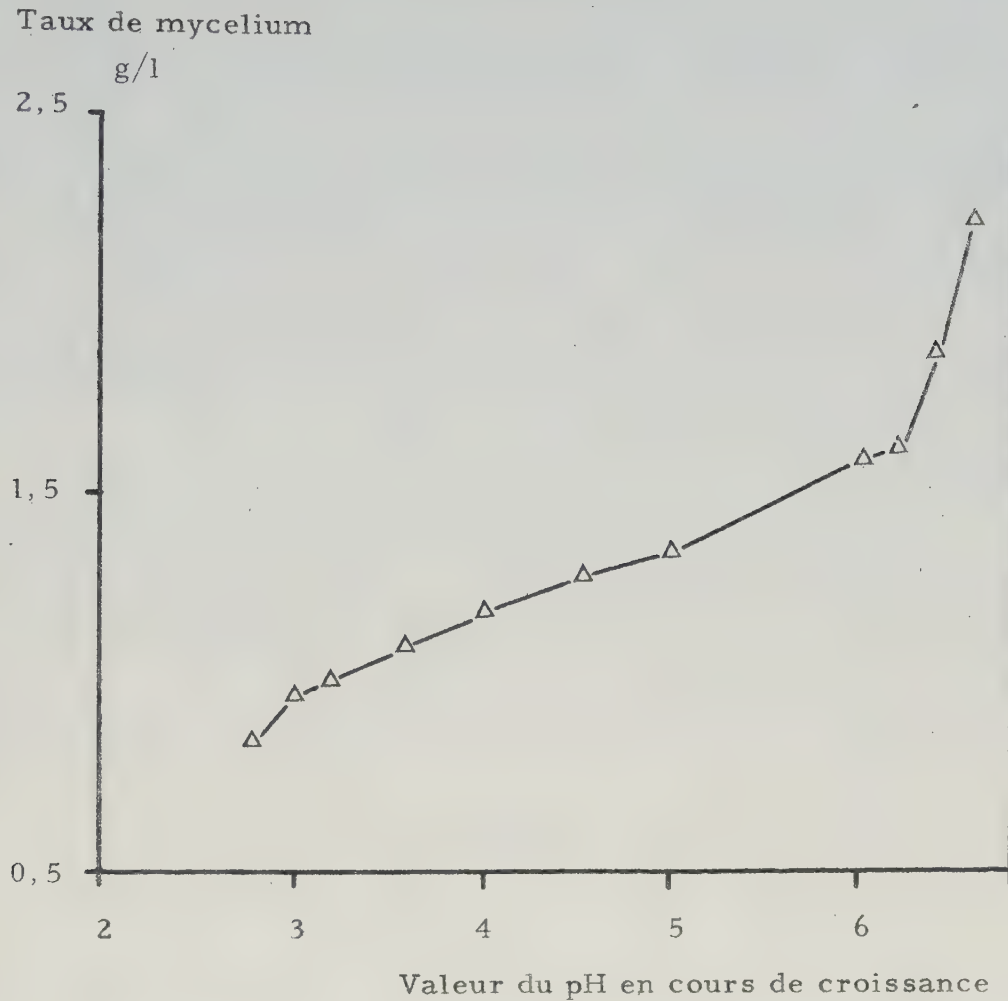
Croissance du mycelium
g/l



Etude comparée des cultures effectuées sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs à 25 g/l

- 1 $\Delta-\Delta$ Cinétique de croissance du mycelium dans la culture effectuée sur cellulose : g/l
- 2 $\blacktriangle-\blacktriangle$ Cinétique de croissance du mycelium dans la culture sur rafles de maïs : g/l
- 3 $\circ-\circ$ Evolution du pH dans la culture sur cellulose
- 4 $\bullet-\bullet$ " " " sur rafles de maïs

GRAPHIQUE 17



Relation entre la quantité de mycelium (g/l) et le pH,
au cours de la culture de *T. viride* sur cellulose
Solka Floc à 25 g/l

(Moyenne de 11 expériences)

dans les cultures de T. viride, sur cellulose Solka Floc, à l'instant initial, le milieu de culture est blanchâtre du fait de la coloration du substrat; puis il prend une teinte jaune au deuxième jour, correspondant à l'acidification du pH; la coloration devient ensuite jaune-orangée (pH 2,75), puis grisâtre pendant la remontée rapide du pH. Lorsque celui-ci atteint la valeur 6,1, le milieu devient vert et la coloration s'intensifie avec la neutralisation du milieu (pH 6,6 - 6,7). De ce fait, l'évolution des cultures de T. viride sur cellulose Solka Floc peut s'apprécier visuellement, et le pH, à un instant donné, estimé avec approximation.

Ainsi la mesure du pH, après la période d'acidification naturelle du milieu, permet de connaître la quantité de mycelium produite à un instant donné. C'est pourquoi, nous avons tracé, sur le graphique 17, la courbe représentant la production du mycelium en fonction du pH.

Remarques :

1) - Les observations précédentes ne semblent avoir été mentionnées par aucun auteur, si ce n'est une acidification du milieu à un pH de 2,7, en fin de culture (49). Cette valeur correspond précisément à une inhibition de la croissance de T. viride et de la production de ses cellulases observée dans certaines de nos expériences :

- culture sur eau échangée au lieu d'eau distillée (chapitre V)
- étude de divers milieux minéraux de cultures (chapitre IV)
- étude du réajustement du pH à sa valeur initiale en cours de croissance (chapitre VI)
- étude de quelques inhibiteurs (non mentionnée dans nos travaux).

L'évolution du pH, telle que nous l'avons décrite, en particulier sa neutralisation en fin de culture, ne semble donc pas avoir attiré l'attention des chercheurs.

2) - Si nous considérons le graphique 16 (courbes 3 et 4), nous constatons que les variations du pH de la culture de T. viride sur rafles de maïs, sont moins sensibles que celles observées dans la culture sur cellulose Solka Floc. En effet :

- dans la culture sur rafles de maïs, l'amplitude du pH est de 2,5 environ, avec un maximum de 6,2 - 6,3 et un minimum de 3,8 - 4.
- dans la culture sur cellulose Solka Floc, l'amplitude du pH est proche de 4, avec un maximum de 6,6 - 6,7 et un minimum de 2,7 - 2,8.

Ces résultats semblent provenir du fait que les rafles de maïs, substrat naturel, doivent contenir des substances susceptibles de créer un effet tampon. Nous n'avons pas trouvé, dans la littérature, de données concernant la teneur en sels minéraux des rafles de maïs.

III - CINETIQUE DE LA PRODUCTION DES CELLULASES ET RELATIONS AVEC L'EVOLUTION DU pH AU COURS DE LA CULTURE :

A/ Conditions opératoires : Dans cette étude, nous avons mesuré :

- L'activité cellulolytique des filtrats de la culture effectuée sur cellulose Solka Floc, envers la cellulose Solka Floc (courbe 4, graphique 18).

- L'activité cellulolytique de la culture globale effectuée sur cellulose Solka Floc envers la cellulose Solka Floc (courbe 5, graphique 18).

- L'activité osidasique des filtrats de la culture effectuée sur rafles de maïs, envers les rafles de maïs (courbe 2, graphique 18).

- L'activité osidasique de la culture globale effectuée sur rafles de maïs, envers les rafles de maïs (courbe 3, graphique 18).

- L'activité cellulolytique des filtrats de la culture effectuée sur rafles de maïs, vis-à-vis de la cellulose (courbe 1, graphique 18).

Les techniques opératoires ont été décrites dans le chapitre I. La concentration du substrat dans les essais enzymatiques est de 100 g/l.

B/ Résultats : (graphique n° 18)

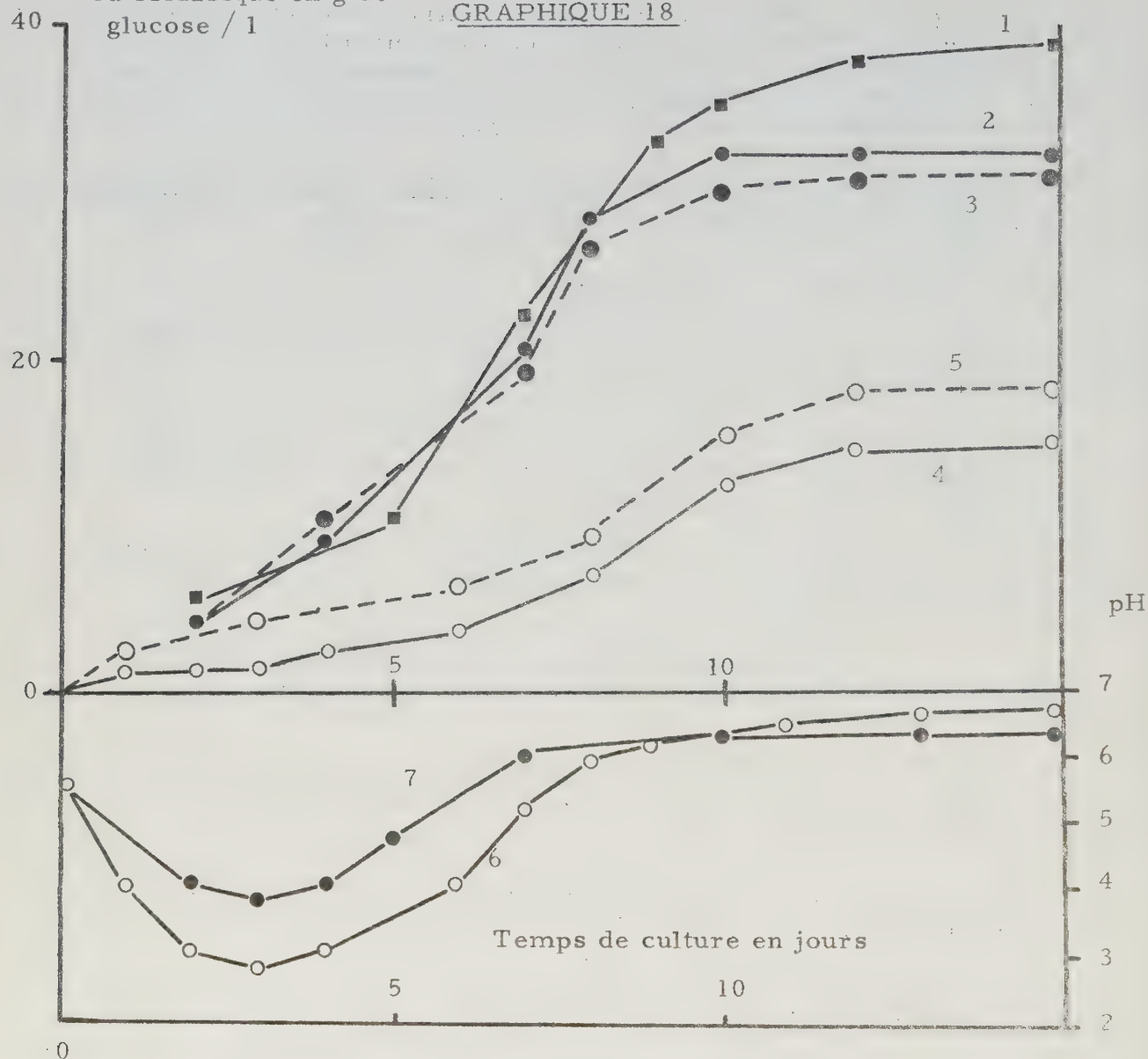
Le graphique n° 18 sur lequel nous avons reporté l'évolution du pH pendant les cultures, illustre les résultats de plusieurs expériences. Plusieurs faits sont à remarquer :

- 1) - La production des cellulases dans les cultures effectuées sur cellulose Solka Floc (courbes 4 et 5) subit un palier correspondant à la période d'acidification naturelle du milieu (courbe 6). Puis elle croît en même temps que le pH pour atteindre un second palier, vers le douzième jour, simultanément à celui du pH.

- 2) - Pendant toute la période d'incubation des cultures de T. viride sur la cellulose Solka Floc, les cultures globales sont plus actives que leurs filtrats, vis-à-vis du substrat, et ce, d'une valeur sensiblement constante et voisine

Activité cellulolytique
ou osidasique en g de
glucose / l

GRAPHIQUE 18



Etude comparée de l'activité cellulolytique (ou osidasique) des filtrats et des cultures globales de *T. viride* effectuées sur cellulose Solka Floc ou rafles de maïs à 25 g/l et mesurée sur cellulose Solka Floc et rafles de maïs, d'après le pouvoir réducteur libéré exprimé en g de glucose par litre. 1 ■—■ Activité cellulolytique du filtrat de culture sur rafles de maïs, mesurée par action sur cellulose Solka Floc à 100 g/l. 2 ●—● Activité osidasique du filtrat de culture effectuée sur rafles de maïs mesurée par action sur rafles de maïs à 100 g/l. 3 ●—● Activité osidasique de la culture globale effectuée sur rafles de maïs mesurée par action sur rafles de maïs à 100 g/l. 4 ○—○ Activité cellulolytique du filtrat de culture effectuée sur cellulose Solka Floc mesurée par action sur cellulose Solka Floc à 100 g/l. 5 ○—○ Activité cellulolytique de la culture globale effectuée sur cellulose Solka Floc, mesurée par action sur cellulose Solka Floc à 100 g/l. 6 ○—○ Evolution du pH dans la culture sur cellulose Solka Floc. 7 ●—● Evolution du pH dans la culture sur rafles de maïs.

de 3 g/l de sucres réducteurs évalués en glucose. Ce fait semble contredire plusieurs observations mentionnées dans la littérature et décrivant une activité semblable de la culture contenant le microorganisme tué par addition d'un antiseptique tel que le chloroforme, et de son filtrat libre de cellules (71).

Cependant, il est bien établi, selon la littérature, que la présence du microorganisme est favorable à la dégradation de la cellulose puisqu'en effet, son pourcentage de dégradation dans la culture est de 70% après quatorze jours d'incubation, alors que le filtrat libre de cellules ne peut dégrader que 16% de cellulose.

Il est possible que la différence d'activité observée entre les cultures globales et leurs filtrats, provienne du fait qu'une certaine quantité de cellulases reste adsorbée sur la cellulose, ainsi que nous l'avons mentionné dans le chapitre III, et accroisse par leur action, la dégradation de la cellulose due aux cellulases solubles, lors de la réaction enzymatique.

3)- L'activité osidasique, envers les rafles de maïs, des cultures de T. viride effectuées sur ce substrat (courbes 2 et 3) est beaucoup plus élevée que le pouvoir cellulolytique des cultures effectuées sur cellulose Solka Floc, envers la cellulose Solka Floc (courbes 4 et 5). Cependant, l'activité osidasique des filtrats de cultures sur rafles de maïs (courbe 2) est plus élevée que celle de la culture globale (courbe 3). Ce phénomène est l'inverse de celui observé pour les cultures sur cellulose Solka Floc (courbes 4 et 5).

4) - L'activité cellulolytique envers la cellulose, est beaucoup plus élevée dans les cultures effectuées sur rafles de maïs (courbe 1) que celle développée dans les cultures sur cellulose (courbe 4), ainsi que nous l'avons remarqué dans le chapitre III, et ce, pendant toute la période d'incubation des cultures. Le rapport de ces activités, évalué en fin de croissance, est de 2,5, en faveur des cultures sur rafles de maïs.

5) - Le palier de la production des cellulases est atteint plus rapidement dans les cultures sur rafles de maïs (10ème jour, courbes 2 et 3), que dans les cultures sur cellulose (12ème jour, courbes 4 et 5).

6) - Nous avons évalué le taux de protéines solubles, dans les filtrats de culture, en fin d'incubation (15ème jour) en multipliant par 100 la quantité d'azote déterminée par la méthode de KJELDAHL. Les résultats obtenus sont les suivants :

- filtrats de culture sur cellulose : 0,210 g/l de protéines,

- filtrats de cultures sur rafles de maïs : 0,65 g/l de protéines.

Si nous considérons le rapport entre l'activité cellulolytique mesurée sur cellulose et évaluée en g de glucose par litre, et le taux de protéines dissoutes, pour chaque culture après quinze jours d'incubation, nous obtenons une valeur U, qui peut représenter l'activité spécifique des cultures dans les conditions que nous avons déterminées :

- filtrats de culture sur cellulose :

$$U_1 = \frac{15}{0,21} = 71,4 \text{ g. de sucres réducteurs par g. de protéines.}$$

- filtrat de culture sur rafles de maïs :

$$U_2 = \frac{38}{0,65} = 58,5 \text{ g. de sucres réducteurs par g de protéines.}$$

Il semblerait donc que l'activité spécifique des cellulases libérées dans les cultures sur cellulose soit plus élevée que celle des cellulases produites dans les cultures sur rafles de maïs.

Remarque : Il est possible que l'azote dosé dans les filtrats de culture soit attribuable en partie, à des protéines étrangères à l'activité β osidasique, ou à des substances azotées non protéiques. Mais la plupart des auteurs calculent les activités spécifiques d'après la quantité totale de protéines dissoutes.

7) - Nous avons déterminé par chromatographie sur papier, la nature et la quantité des sucres réducteurs libérés par l'action des filtrats, obtenus après quinze jours d'incubation, sur la cellulose à 100 g/l. Les valeurs obtenues ont été décrites dans les tableaux n° 4, chapitre I.

IV - CINETIQUE DE LA CONSOMMATION DES IONS ET RELATIONS AVEC L'EVOLUTION du pH AU COURS DE LA CULTURE :

A/ Introduction et méthodes de dosages :

L'étude de l'évolution du pH au cours de la croissance de T. viride, nous a amenés à penser que l'acidification du milieu pouvait être due à la disparition de certains cations de la solution minérale. B. FORTKANS (49) qui remarque un pH final de 2,7, attribue ce phénomène en grande partie aux ions minéraux. Mais il semble qu'aucune étude précise n'ait été faite à ce propos. C'est pourquoi nous avons effectué une étude systématique de la consommation par T. viride, des ions principaux : Ammonium, Potassium, Magnésium, Nitrates. Pour cette étude, nous avons été amenés à utiliser plusieurs méthodes de dosages :

1) - Dosage des ions ammonium :

Après centrifugation des prélèvements de 10 ml effectués sur la culture, l'ammonium est dosé sur 8 ml de surnageant par la méthode de KJELDAHL (32) sans minéralisation préalable de la solution.

Erreur : $\pm 1,5 \%$.

2) - Dosage des nitrates :

La méthode de J. COTTE et E. KAHANE (8) basée sur la réduction des nitrates en ammonium par le sulfate ferreux en milieu alcalin, consiste en une distillation de l'ammoniaque provenant des nitrates réduits, dans de l'acide chlorhydrique titré : $\frac{N}{10}$. Les dosages s'effectuent sur des volumes de filtrats de 100 à 5 ml. Les ions ammonium présents dans le milieu avant la réduction et dosés par la méthode précédente, sont retranchés à la quantité trouvée après la réduction des nitrates.

Précision : 2, 5 %

3) - Dosage du Potassium

Nous avons utilisé la spectrométrie de flamme qui est la méthode la plus simple et la plus rapide. Les dosages sont effectués sur 1 ml de filtrat de culture, dilué 2 fois.

4) - Dosage du Magnésium

Ce cation est dosé par complexométrie à l'EDTA, avec le réactif noir ériochrome T, et en milieu ammoniacal ; les mesures sont effectuées sur 20 ml de filtrat de culture étant donné la faible concentration de cet ion.

Remarque :

- la disparition des ions sodium et phosphate n'a pu être évaluée, étant données leurs faibles consommations par T.viride, par rapport aux concentrations initiales élevées (1847 mg/l pour les ions sodium et 2620 mg/l pour les ions phosphates).

- la consommation des ions sulfate n'a pu être évaluée, du fait de la présence des ions phosphate en quantité vingt-cinq fois supérieure.

- l'étude de la consommation des ions a été réalisée sur les cultures effectuées sur cellulose Solka Floc à 25 g/l.

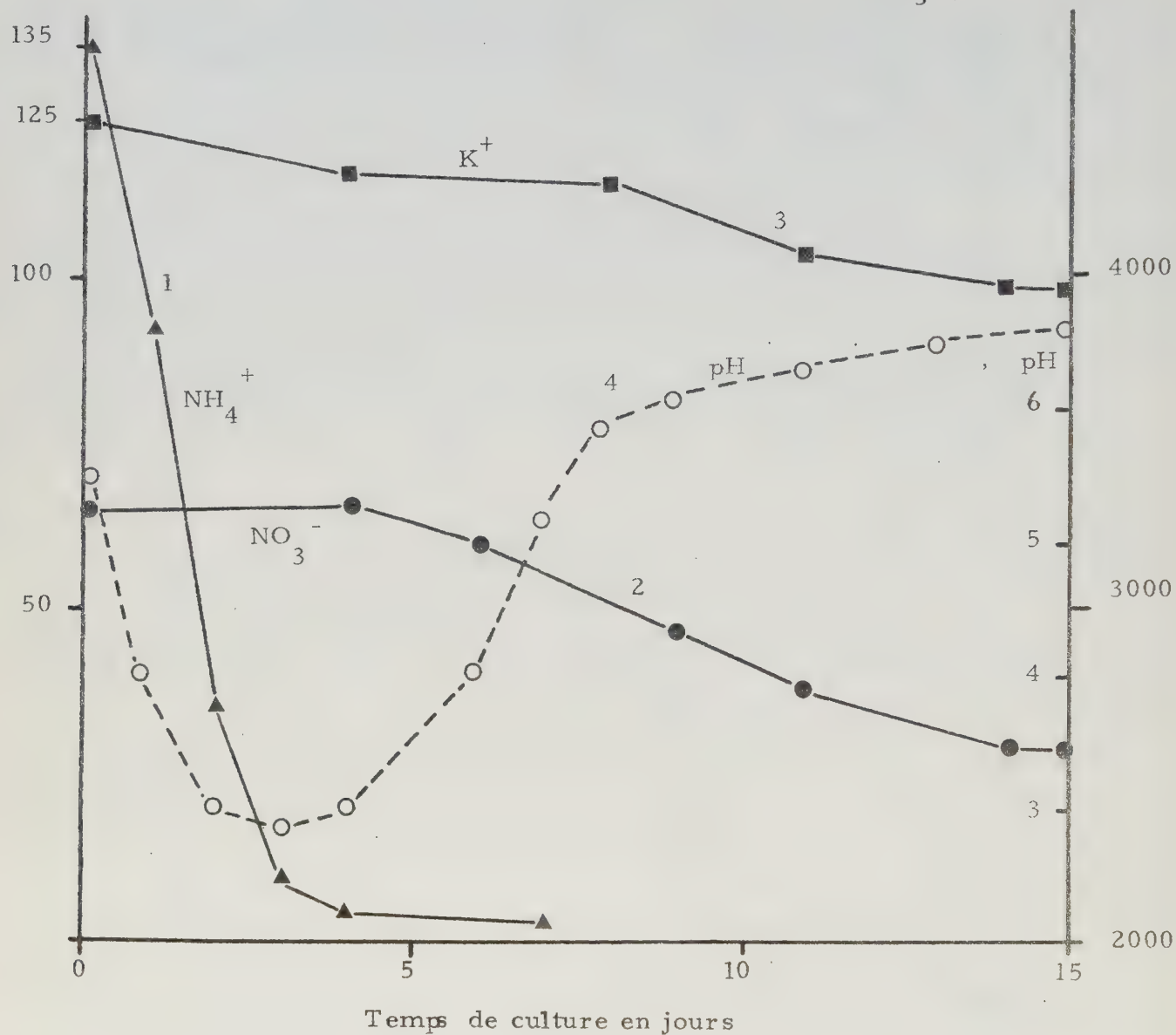
B/ Résultats et discussion : (graphique 19)

1) Magnésium : La variation des ions Mg^{2+} est très faible pendant les cultures, puisque la concentration passe

Cocentration des ions
 NH_4^+ et K^+ (mg/l)

GRAPHIQUE 19

Concentration des ions
 NO_3^- mg/l



Cinétique d'une culture témoin de *T. viride* sur cellulose Solka Floc à 25 g/l

- 1 ▲—▲ Cinétique de la consommation des ions ammonium
- 2 ●—● " " " nitrate
- 3 ■—■ " " " potassium
- 4 O--O Evolution du pH pendant la culture

de 29,5 mg/l au temps 0, à 28,5 mg/l au temps quatorze jours. L'utilisation de ces ions est donc de 1 mg/l environ mais il faut tenir compte des erreurs possibles dues à leur très faible concentration.

2) - Potassium (courbe 3)

La variation globale de la concentration de ces ions dans le milieu de culture entre le temps 0 et le temps quatorze jours, est de 27 mg. Etant donnée la faible concentration initiale, 124 mg/l, le pourcentage de potassium utilisé est appréciable puisqu'il est de 20%.

Remarque : Cette consommation est très faible durant les premiers jours et ne peut influencer le pH de façon significative.

3) - Ammonium et nitrates : (courbes 1 et 2)

L'étude de la consommation de ces ions est essentielle, puisqu'ils constituent les deux seules sources d'azote pour le champignon.

Deux observations importantes sont à noter :

a) - le graphique n° 19 nous révèle une utilisation préférentielle des ions ammonium par T. viride (courbe 1) par une chute brusque et quasi totale de leur concentration après les quatre premiers jours de culture, alors que les ions nitrate ne sont consommés qu'après cette période (courbe 2). D'autre part, la quantité d'azote relative au mycelium apparaissant dans la masse fongiale, correspond à la disparition successive des ions ammonium et nitrate. Le tableau n° 15 suivant, nous montre l'utilisation de ces ions en fonction de la quantité d'azote relative au mycelium apparaissant dans la masse fongiale.

b) si nous comparons les courbes du pH et de la consommation des ions ammonium, nous remarquons que l'acidification du milieu correspond exactement à la période d'utilisation de ces ions par le champignon. Le problème était de savoir si la chute du pH de 5,5 à 2,7 observée pendant les premiers jours, était due en totalité ou en partie à la disparition de l'ammonium de la solution. A ce propos, travaillant sur T. viride, B. NORKRANS (49) signale que : "l'acidification semble être attribuable principalement aux cations, puisque les chromatographies préliminaires sur papier ne révèlent pas de grandes quantités d'acides organiques libérés par le métabolisme". Notre étude a été orientée de la manière suivante : sur une culture réalisée dans les conditions décrites précédemment, des prélèvements quotidiens de 10 ml sont effectués dans lesquels les ions ammonium sont

Tableau n° 15 : Utilisation des ions NH_4^+ et NO_3^- par <i>T. viride</i> pendant sa croissance sur cellulose Solka Floc à 25 g/l.									
Temps en jours	1	2	3	4	6	9	11	14	
Âzote correspondant à NH_4^+ disparu de la solution : mg/l	33,5	77	98	102	104	104	104	104	
Âzote correspondant à NO_3^- disparu de la solution : mg/l	0	0	0	0	11,2	75	111	155	
Âzote correspondant à NH_4^+ et NO_3^- disparus de la solution mg/l	33,5	77	98	102	144,2	208	244	288	
Âzote du mycelium apparaissant dans la masse fondiale mg/l	36	72	93	104	140	192	228	268	
Comparaison : azote disparu moins azote du mycelium : mg/l	2,5	5	5	-2	4,2	16	16	20	
Variations relatives entre la quantité d'azote disparue de la solution et celle apparue dans le mycelium en %.	-7	6,5	5,5	-2	3	8	6,5	7	

dosés. Sur un second prélèvement de 10 ml, le pH est mesuré puis ajusté à sa valeur initiale 5,5 par addition d'ammoniaque 0,1N et les ions ammonium sont à nouveau dosés. Les mesures réalisées pendant la période d'acidification sont consignées dans le tableau suivant n° 16.

Tableau n° 16 : Relations existant entre la consommation des ions ammonium et l'acidification du pH dans une culture témoin de <i>T. viride</i> sur cellulose Solka Floc.							
Temps en jours	pH	NH_4^+ mg/l dissous dans le milieu	NH_4^+ ajouté pour compenser la chute de pH : mg/l	NH_4^+ dosé après ajustement du pH : mg/l	Différence entre la quantité de NH_4^+ initiale et la quantité trouvée après ajustement du pH : mg/l	Erreur %	
0	5,5	135	0				
1	4,0	92	35	128	7	5	
2	3,05	35	90	127	8	6	
3	2,8	3	105	110	25	18,5	
4	3,15	x	x	x	x	x	

Nous remarquons que, pendant les deux premiers jours, la différence entre la quantité d'ammonium initiale et la quantité trouvée après réajustement du pH à 5,5 est de l'ordre de 5% par défaut. Si l'acidification du milieu avait une autre origine que la disparition de ces ions, telle que la libération dans le milieu d'acides organiques, la quantité d'ammonium rajoutée aurait été telle, que leur concentration totale, après cette opération, soit supérieure à la valeur initiale 135mg/l. Cependant, il est possible qu'une faible quantité d'acides organiques soit libérée mais seulement après trois ou quatre jours de culture.

Compte tenu des erreurs de mesures, nous pouvons affirmer que l'acidification du pH est attribuable à la consommation des ions ammonium dans la proportion de 95%.

c) - Remarques :

1. Nous n'avons pu effectuer de mesures cinétiques de la consommation des ions dans les cultures sur rafles de maïs, mais nous avons dosé la quantité d'ions ammonium restant en solution en fin de culture et trouvé une valeur de 35 mg/l. Ceci indique que T. viride utilise moins d'ammonium lorsqu'il est cultivé sur rafles de maïs (100 mg/l) que lorsqu'il se développe sur la cellulose Solka Floc (133 mg/l).

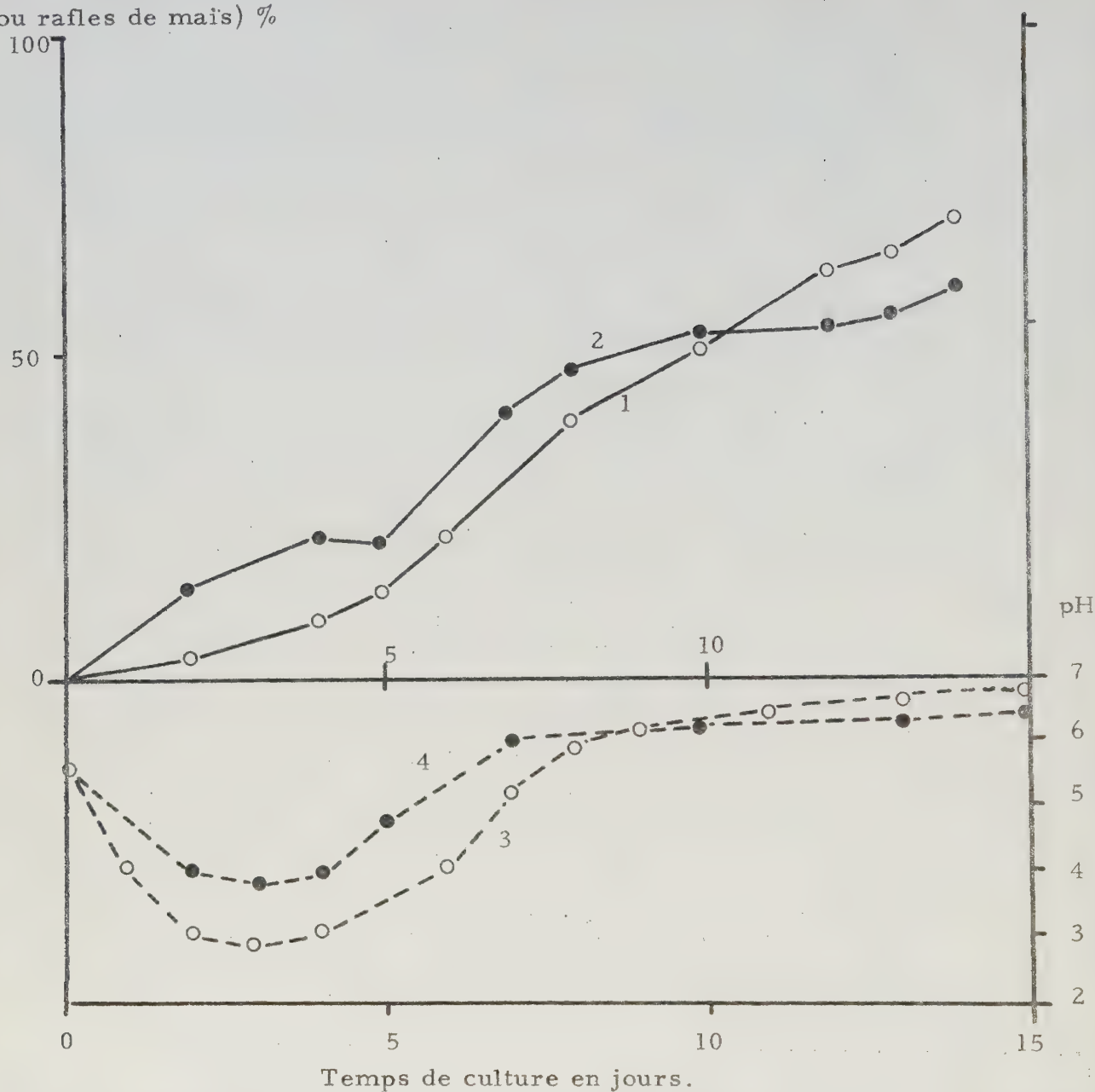
Comme nous l'avons vu antérieurement, l'évaluation du mycelium produit dans les cultures sur rafles de maïs, par le dosage du tryptophane, montre que T. viride ne semble pas utiliser l'azote contenu dans le substrat naturel. Il est donc possible qu'il consomme une plus grande quantité d'ions nitrate que lorsqu'il est cultivé sur cellulose Solka Floc.

2. Au cours de nos expériences, nous avons été amenés à utiliser alternativement, de l'eau échangée sur des résines LEWATIT, et de l'eau distillée dans un alambic en cuivre. Nous avons alors observé des différences très marquées dans le développement de T. viride cultivé sur cellulose Solka Floc. Le tableau n°17 ci-dessous, montre la production de mycelium, après quatorze jours de culture effectuée dans les conditions décrites antérieurement :

TABLEAU n° 17 : Influence de la nature de l'eau sur la production de mycelium dans les cultures de <u>T. viride</u> sur cellulose Solka Floc à 25 g/l incubées quatorze jours.						
Nature de l'eau	Résistivité de l'eau OhmXcmX10 ⁵	pH initial des cultures	pH final des cultures	Mycelium g/l :		
échangée :	50-200	5,5	3	0,8	:	:
distillée :	0,3-0,5	5,5	6,6	2,15	:	:

Perte de poids du substrat (cellulose Solka Floc ou rafles de maïs) %

GRAPHIQUE 20



Etude comparée des cultures effectuées sur cellulose Solka Floc et rafles de maïs à 25 g/l

Pourcentage de perte de poids du substrat dans les cultures

- 1 O—O Pourcentage de perte de poids de la cellulose Solka Floc dans la culture de *T. viride* effectuée sur cellulose Solka Floc
- 2 ●—● Pourcentage de perte de poids des rafles de maïs dans la culture de *T. viride* effectuée sur rafles de maïs.
- 3 O--O Evolution du pH dans la culture sur cellulose Solka Floc
- 4 ●--● " " " rafles de maïs.

Il semble que l'eau échangée constitue un milieu impropre au développement de T. viride, pour plusieurs raisons :

- elle est dépourvue des oligoéléments, (certains sont présents dans l'eau distillée, tels que le cuivre), qui sont nécessaires à la croissance du champignon.

- Au cours du passage de l'eau à travers les résines échangeuses d'ions, il est possible que certaines substances toxiques, telles que les amines qui entrent dans la composition des résines, se dissolvent.

C'est pourquoi, toutes les expériences que nous décrivons dans notre étude, ont été réalisées avec de l'eau distillée.

POURCENTAGE DE PERTE DE POIDS DES SUBSTRATS PENDANT LES CULTURES:

Le graphique n°20 nous permet d'observer en début de culture une perte de poids plus élevée pour les rafles de maïs (courbe 2), que pour la cellulose Solka Floc (courbe 1), mais le pourcentage de dégradation est plus élevé dans ce dernier cas (70% contre 60%) en fin de culture.

Comme nous l'avons remarqué plus haut, les rafles de maïs, substrat naturel, contiennent :

- d'une part de la lignine qui doit être dégradée rapidement puisqu'elle constitue un inhibiteur des cellulases, d'où une perte de poids plus importante que pour la cellulose;

- d'autre part, des substances non osidiques qui ne sont pas dégradées par le champignon, d'où une perte de poids inférieure à celle de la cellulose observée en fin de culture.

Nous avons reporté sur le graphique n°20 l'évolution du pH dans les cultures sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs (courbes 3 et 4), et nous pouvons remarquer, en début de culture, un léger palier dans la cinétique de dégradation des substrats cellulosiques correspondant à la période d'acidification naturelles des milieux.

- CONCLUSIONS -

Le tableau n°18 ci-dessous, résume les résultats comparatifs de cultures effectuées sur la cellulose de référence et sur les rafles de maïs.

TABLEAU N° 18 : Comparaison des résultats obtenus à partir de deux cultures de <u>T. viride</u> effectuées sur deux substrats différents : cellulose Solka Floc BW 200 25 g/l et sur rafles de maïs dont la dimension des graines est identique à celle de la Solka Floc BW 200. L'activité des filtrats de culture est testée sur cellulose à 100 g/l après 48 h. de réaction enzymatique et mesurée d'après le pouvoir réducteur global rapporté en g de glucose par litre.									
Nature	pH	Production	Temps nécessaire à l'obtention du palier	Quantité de substrat dégradé pendant la culture	Activité cellulolytique des filtrats	Cellulose dégradée par les filtrats			
du	de fin	Mycelium	de crois-	sance, pendant la culture	g glucose /l après 48h. de réaction	de réaction			
Substrat	de culture	à 14 jours	g/l	jours	%	48h. de réaction			
de la culture	re.	:	:	:	:	:			
Cellulose	6,6 - 6,7	2,3	:	14	:	70	:	15-16	16%
Rafles de maïs	6,2 - 6,4	2-2,1	:	11-12	:	60	:	37-39	40%

Si la production de mycelium est légèrement inférieure dans les cultures sur rafles de maïs (10%), la production de cellulases est cependant beaucoup plus élevée (250%).

Les mesures cinétiques effectuées sur les cultures réalisées sur la cellulose Solka Floc, nous ont permis de faire plusieurs observations intéressantes :

1) - Les ions ammonium sont consommés très rapidement en quatre jours. Le fait d'augmenter la concentration de ces ions dans le milieu de culture est susceptible d'exercer un effet favorable sur le développement du champignon. C'est ainsi que TOYAMA (80) a décrit que la concentration optimum en ions ammonium correspondait à $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 1% (soit $\text{NH}_4^+ = 2,72 \text{ g/l.}$) Cette valeur représente vingt fois

la concentration que nous avons utilisée dans notre milieu témoin (0,135 g/l).

2) - L'acidification observée durant les quatre premiers jours est susceptible de freiner la croissance de T. viride. C'est ainsi que l'activité cellulolytique libérée dans la culture . . . effectuée sur cellulose Solka Floc est constante durant cette période (graphique n°18). D'autre part, nous avons remarqué, lors de certaines expériences, un léger palier de croissance succédant à cette période, entre le quatrième et le cinquième jour.

Nous avons donc orienté nos recherches vers la suppression de la période d'acidification du milieu en cours de croissance, de deux manières différents :

- a) en utilisant des milieux tampons plus efficaces que celui de référence,
- b) en essayant de compenser l'acidification au cours de la culture, en réajustant le pH à sa valeur initiale 5,5.

3) - Après la période d'acidification, le pH de fin de culture est toujours voisin de 6,6. Cette valeur est donc susceptible d'être favorable à la croissance du champignon. C'est ainsi que la littérature indique des valeurs de pH initial comprises entre 5,5 et 6,6 selon les auteurs.

Nous avons procédé selon deux méthodes différentes:

a) En utilisant soit le milieu de référence, mais à pH 6,6 (21), soit un milieu tampon plus efficace, de même pH. Ces opérations sont, du même fait, susceptibles d'éviter la période d'acidification observée avec le pH 5,5 et se superposant aux précédentes.

b) En réduisant la période de neutralisation de culture témoin, qui s'étale sur plusieurs jours (du 5ème au 12ème), par un réajustement du pH à la valeur 6,3 proche du pH final 6,6 immédiatement après la période d'acidification du milieu, c'est-à-dire au 4ème jour.

CHAPITRE VI

MODIFICATIONS APPORTEES A LA COMPOSITION IONIQUE ET AU
pH DU MILIEU DE CULTURE ET INFLUENCE SUR LA CROISSANCE
DU MYCELIUM ET SUR LA PRODUCTION DE CELLULASES

Les perspectives d'expériences, qui apparaissent dans les conclusions du chapitre précédent, ont été groupées selon le plan de travail suivant :

- Modifications de la composition ionique et du pH du milieu avant la réalisation de la culture : étude de divers milieux minéraux.
- Modifications de la composition ionique et du pH, au cours de la croissance.

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION IONIQUE ET DU pH
DU MILIEU AVANT LA REALISATION DE LA CULTURE -

Etude de divers milieux minéraux

Les expériences qui suivent consistent en une comparaison des cultures sur milieu de référence à pH 5,5 et 6,6, sur milieux tampons à pH 5,5 et 6,6, et sur milieux dont la concentration en ammonium est accrue. Le substrat utilisé est la cellulose de référence SOLKA FLOC.

I - MODE OPERATOIRE :

Nous avons constitué six milieux différents :

Milieu 1 : Milieu témoin dont la composition a été décrite au chapitre I, page 16.

pH de la solution 6,6. Ce pH est ajusté à 5,5 par addition d'acide chlorydrique concentré.

Milieu 2 : La composition est celle du milieu témoin où l'on a doublé la concentration des ions ammonium par addition de 600 mg/l de NH_4NO_3 , d'où : $\text{NH}_4^+ = 270 \text{ mg/l}$.

Milieu 3 : Nous avons modifié le milieu témoin en remplaçant les ions sodium par des ions ammonium sous forme de nitrate. La concentration ionique du milieu devient ainsi :

NH_4^+	940 mg/l	PO_4^3	2620 mg/l
K^+	1847 "	Mg^{2+}	29,5 "
NO_3^-	3237 "	SO_4^{2-}	116,9 "

La concentration des ions ammonium est 7 fois supérieure à celle du milieu 1.

Remarque : TOYAMA (79) utilise pour les cultures de T.viride un milieu dans lequel il remplace les ions sodium par les ions ammonium mais sous forme de sulfate.

Milieu 4 : La composition est celle du milieu 1, mais le pH n'est pas ajusté à 5,5 avec HCl. Nous conservons la valeur 6,6 obtenue après la réalisation de la solution minérale de référence.

Milieu 5 : Nous avons composé un milieu tampon de pH 5,5, d'après les tables du mémento scientifique Geigy (15).

KH_2PO_4	9,078 g/l	960 ml	:	<u>Concentration ionique mg/l</u>	
Na_2HPO_4	9,53	40 ml	:	NH_4^+	135
	NH_4NO_3	600 mg/l	:	Na^+	1324,6
	+ NaNO_3	3800 mg/l	:	K^+	2480,8
	+ MgSO_4	300 mg/l	:	Mg^{2+}	29,5
			:	PO_4^{3-}	6361
			:	NO_3^-	3237
			:	SO_4^{2-}	116,9

Milieu 6 : Une autre solution tampon à pH 6,5 a été réalisée selon les tables du mémento scientifique Geigy (15).

			:	<u>concentration ionique mg/l</u>	
KH_2PO_4	9,078 g/l	700 ml	:	NH_4^+	135
Na_2HPO_4	9,53 g/l	300 ml	:	Na^+	1489
	+ NH_4NO_3	600 mg/l	:	K^+	1087,9
	+ NaNO_3	3800 "	:	Mg^{2+}	29,5
	+ MgSO_4	300 "	:	PO_4^{3-}	4630
			:	NO_3^-	3237
			:	SO_4^{2-}	116,9

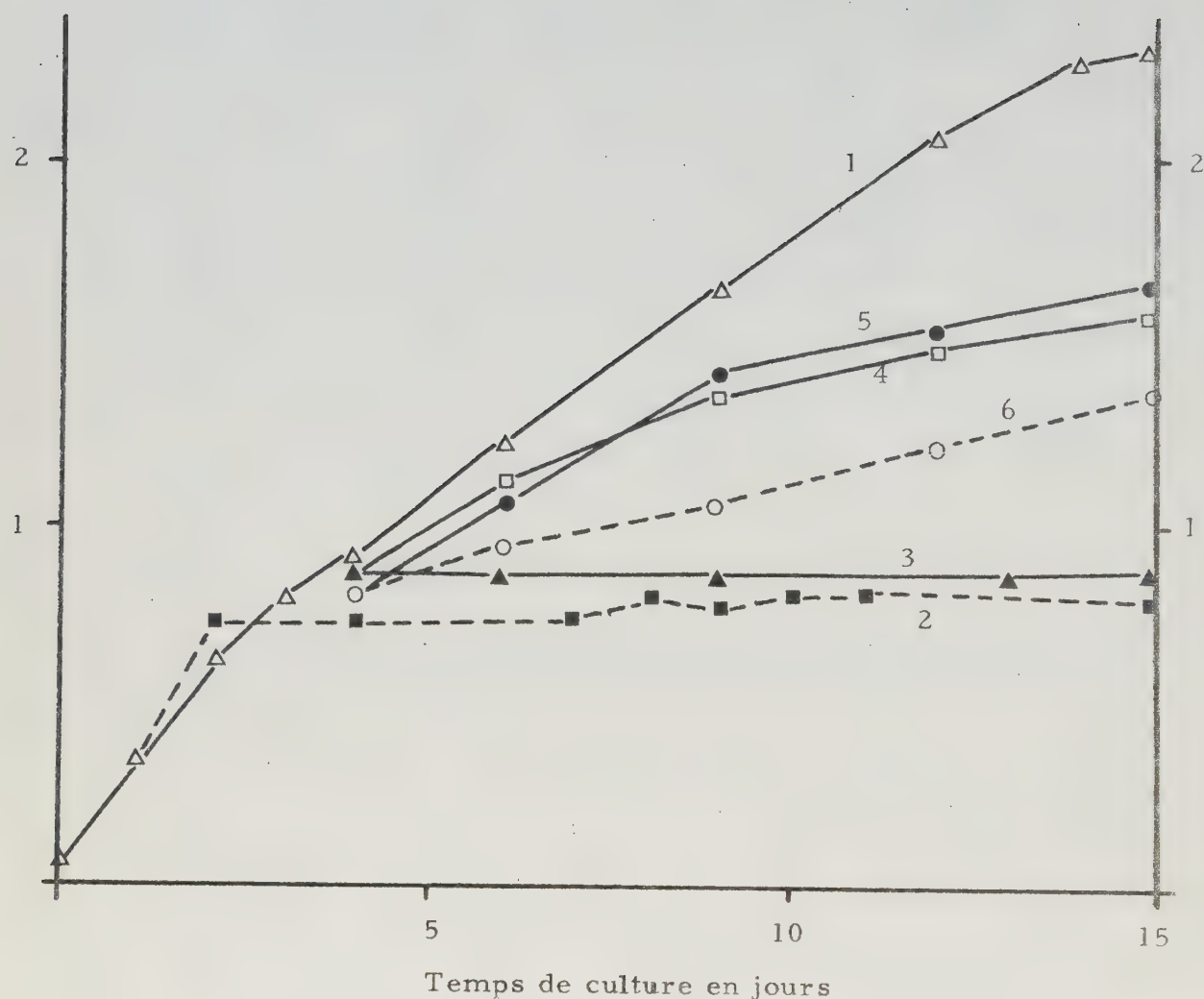
Les conditions de culture sont celles décrites au chapitre V.

II - RESULTATS ET DISCUSSIONS (Graphiques n° 21-22-23-24).

Les graphiques 21 et 22 nous montrent que le milieu témoin est de loin le plus favorable au développement de T.viride dans les conditions telles qu'elles ont été définies plus haut. Les conclusions suivantes s'imposent donc :

GRAPHIQUE 21

Croissance du mycelium
dans les cultures g/l



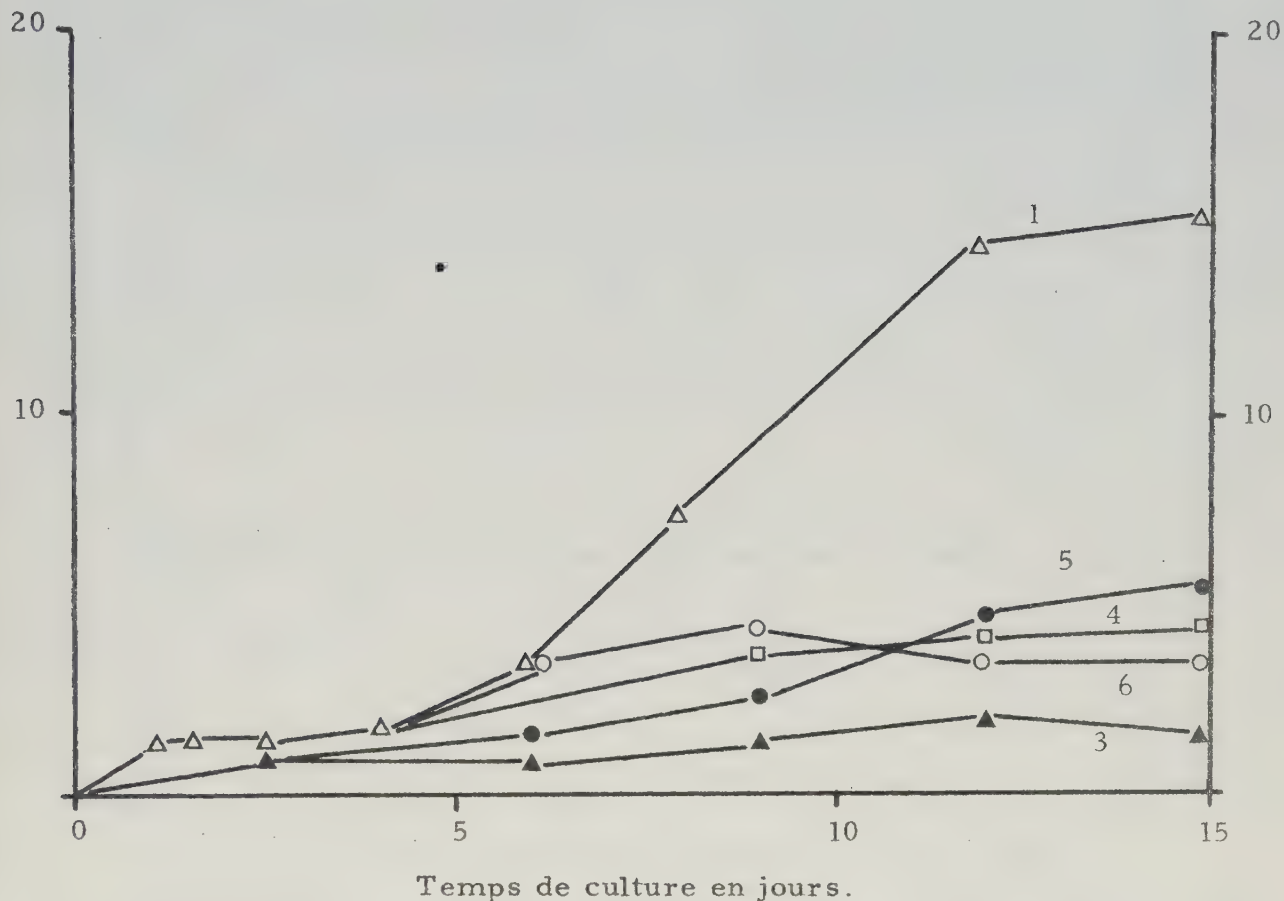
Etude de divers milieux de culture de *T. viride* - Courbe de croissance du mycelium.

Le substrat de culture est la cellulose Solka Floc à 25 g/l

- 1 Δ—Δ Milieu de référence (croissance témoin) pH 5,5
- 2 ■--■ Milieu témoin où les ions ammonium ont été doublés
- 3 ▲—▲ Milieu témoin où les ions sodium ont été remplacés par les ions ammonium
- 4 □—□ Milieu témoin à pH 6,6
- 5 ●—● Milieu tampon KH_2PO_4 (9,078 g/l) : 960 ml Na_2HPO_4 (9,53 g/l) 40ml
pH 5,5
- 6 ○--○ Milieu tampon KH_2PO_4 (9,078 g/l) : 700 ml Na_2HPO_4 (9,53 g/l) 300 ml
pH 6,5

Activité cellulolytique
des filtrats en g de
glucose / l

Graphique 22



Etude de divers milieux de cultures de *T. viride* - Concentration en cellulose dans les cultures 25 g/l - Cinétique de l'activité cellulolytique libérée pendant les cultures, mesurée après action des filtrats sur 100 g de cellulose par litre, d'après le pouvoir réducteur apparu évalué en g de glucose par litre - temps de la réaction enzymatique : 48 h.

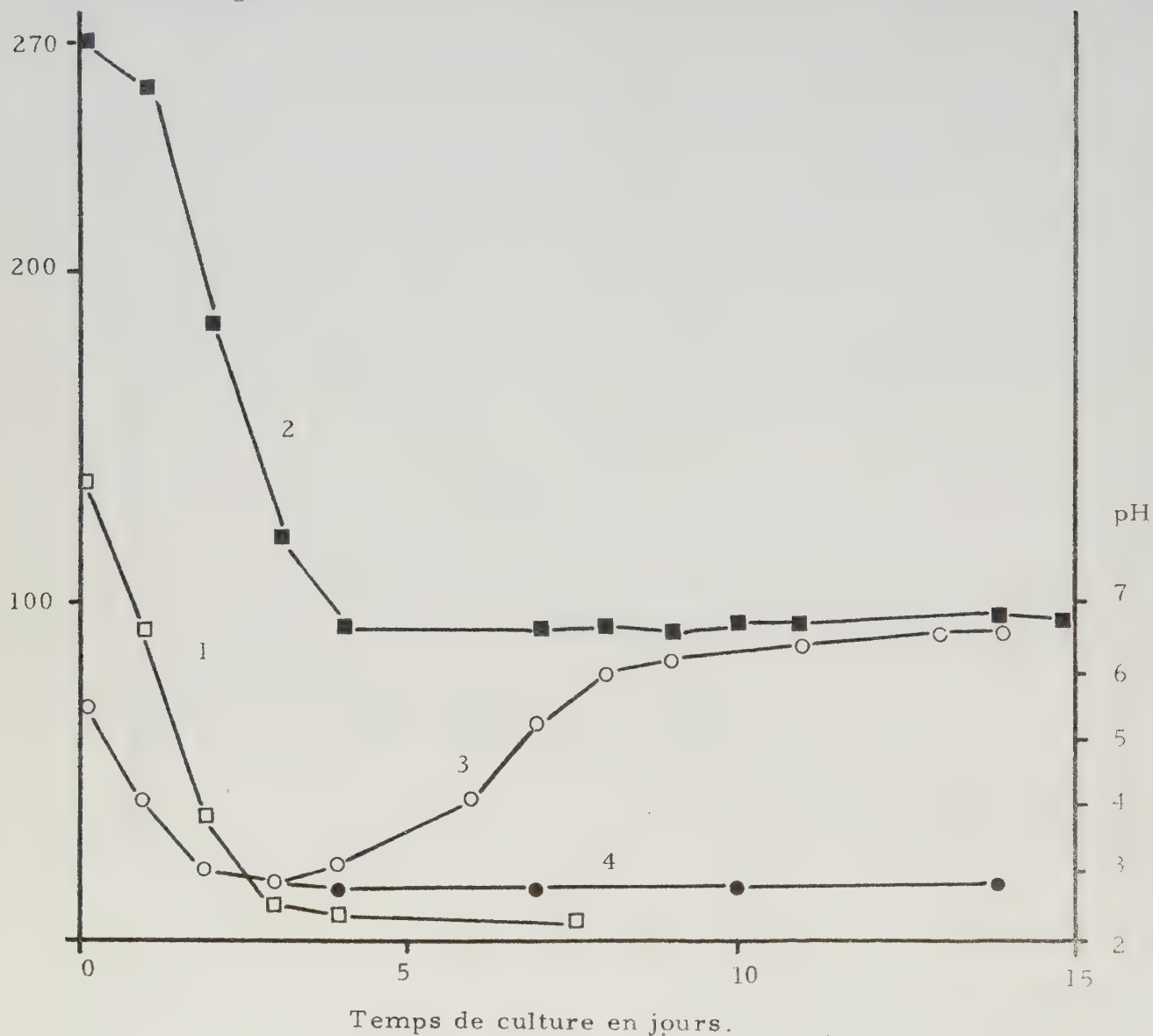
1 Δ—Δ Milieu de référence (témoin) pH 5,5

3 ▲—▲ " témoin où les ions sodium ont été remplacés par les ions ammonium.

4 □—□ Milieu témoin pH 6,6

5 ●—● " tampon KH_2PO_4 (9,078 g/l) : 960 ml, Na_2HPO_4 (9,53 g/l) : 40 ml, pH 5,5

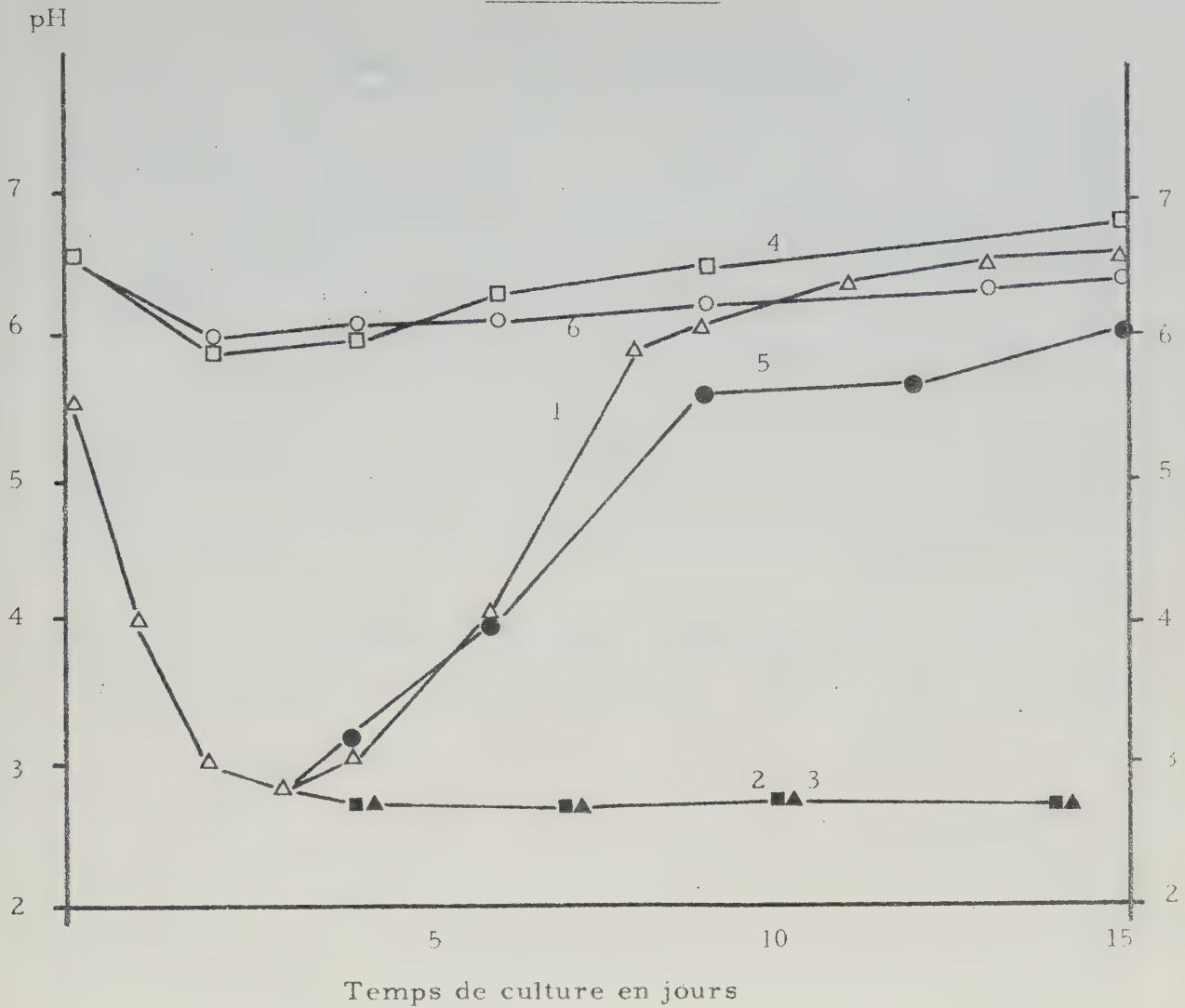
6 ○—○ Milieu tampon KH_2PO_4 (9,078 g/l) : 700 ml, Na_2HPO_4 (9,53 g/l) : 300 ml, pH 6,5
(l'activité cellulolytique du milieu 2 n'a pas été étudiée).



Etude de divers milieux de cultures de *T. viride*. Consommation des ions ammonium et évolution du pH dans les milieux 1 et 2.

- 1 $\square-\square$ consommation des ions ammonium dans le milieu 1 (témoins)
 2 $\blacksquare-\blacksquare$ " " " " 2 où la concentra-
 tion initiale des ions ammonium a été doublée
 3 $\circ-\circ$ évolution du pH dans la culture 1 (témoins)
 4 $\bullet-\bullet$ " " " " 2

GRAPHIQUE 24



Etude de divers milieux de cultures de *T. viride*. Concentration en cellulose dans les cultures 25 g/l. Evolution du pH dans les milieux en cours de croissance.

- 1 Δ-Δ Milieu de référence (témoin) pH 5,5 ions ammonium (135 mg/l)
- 2 ■-■ " témoin où les ions ammonium ont été doublés (270 mg/l)
- 3 ▲-▲ " " " sodium " " remplacés par les ions ammonium
- 4 □-□ Milieu témoin pH 6,6
- 5 ●-● Milieu tampon KH_2PO_4 (9,078 g/l) : 960 ml, NaH_2PO_4 (9,53 g/l) : 40 ml, pH 5,5
- 6 ○-○ Milieu tampon " " 700 ml, " " " 300 ml, pH 6,5

1) - La concentration des ions ammonium joue un rôle essentiel. Contrairement aux résultats de Toyama, celle-ci doit être très faible dans le milieu et analogue à celle du milieu de référence utilisé. Le simple fait de doubler cette concentration (graphique n°21, courbe 2) inhibe la croissance de T. viride de 60%. Dans ce cas, nous remarquons que la moitié des ions environ sont consommés (graphique n°23, courbe 2), c'est-à-dire la quantité existant dans le milieu témoin (graphique n°23, courbe 1). Les résultats sont identiques pour une concentration 7 fois supérieure en ions ammonium (graphique n°23, courbe 3).

2) Le fait d'utiliser des milieux de pH initial 6,6, valeur du pH final de la culture témoin, supprime presque totalement l'acidification du milieu (graphique n°24, courbes 4 et 6), mais réduit aussi le développement du mycelium et de l'activité cellulolytique (graphiques 21 et 22, courbes 4 et 6).

Ainsi contrairement à certaines données de la littérature, le pH 5,5 semble plus favorable à la culture de T. viride que le pH 6,6 dans les conditions expérimentales utilisées.

3) L'utilisation de la solution tampon phosphate de pH 5,5 n'a pas supprimé l'acidification du milieu de culture (graphique n°24, courbe 5). D'autre part, les résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec le milieu témoin (graphiques n° 21 et 22, courbe 5).

Il semble donc que les concentrations relatives des ions telles qu'elles sont définies dans le milieu 1, doivent être respectées, en particulier le rapport $\frac{Na}{k}$ dont la valeur est proche de 15.

III - CONCLUSIONS : Si les expériences précédentes n'ont pas donné de résultats positifs, elles ont permis néanmoins de faire des remarques très importantes :

1) - les conditions étant telles que nous les avons définies, le pH 5,5 semble le plus favorable à la culture de T. viride.

2) - l'acidification du milieu durant les quatre premiers jours semble nécessaire au développement du champignon comme nous le confirment les expériences qui suivent.

3) - la présence des ions ammonium est nécessaire car ils constituent une source d'azote très vite assimilable, mais leur concentration doit être faible et de l'ordre de celle du milieu de référence.

4) - les concentrations relatives des ions, telles qu'elles existent dans ce milieu, semblent ne pas devoir être modifiées et en particulier le rapport $\frac{Na}{k}$ qui est proche de 15.

Nous conservons donc, pour les expériences ultérieures, la composition et le pH du milieu de référence.

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION IONIQUE ET DU pH AU COURS DE LA CULTURE -

I - INTRODUCTION :

La modification du milieu initial n'ayant apporté aucun résultat positif, nous avons fait varier la concentration de certains ions pendant la culture. Trois séries d'expériences composent cette étude :

1) - Cultures sur cellulose Solka Floc, dont le pH est réajusté à sa valeur initiale 5,5 pendant une période prolongée, dans le but de compenser l'acidification naturelle du milieu.

2) - Cultures sur cellulose Solka Floc, dont le pH est réajusté à sa valeur initiale 5,5, pendant la période correspondant à l'acidification naturelle du milieu.

3) - Cultures sur cellulose ou rafles de maïs dont le pH est ajusté à une valeur proche de la valeur finale, c'est-à-dire 6,6 pour les cultures sur cellulose et 6,2 pour les cultures sur rafles de maïs, seulement après l'acidification du milieu, dans le but de réduire la période relativement longue (sept jours) pendant laquelle le pH tend vers la neutralité.

Les conditions de cultures et la composition des milieux sont celles que nous avons décrites dans le chapitre V.

II - REAJUSTEMENT DU pH A SA VALEUR INITIALE PENDANT UNE PERIODE PROLONGEE

A/ Conditions opératoires :

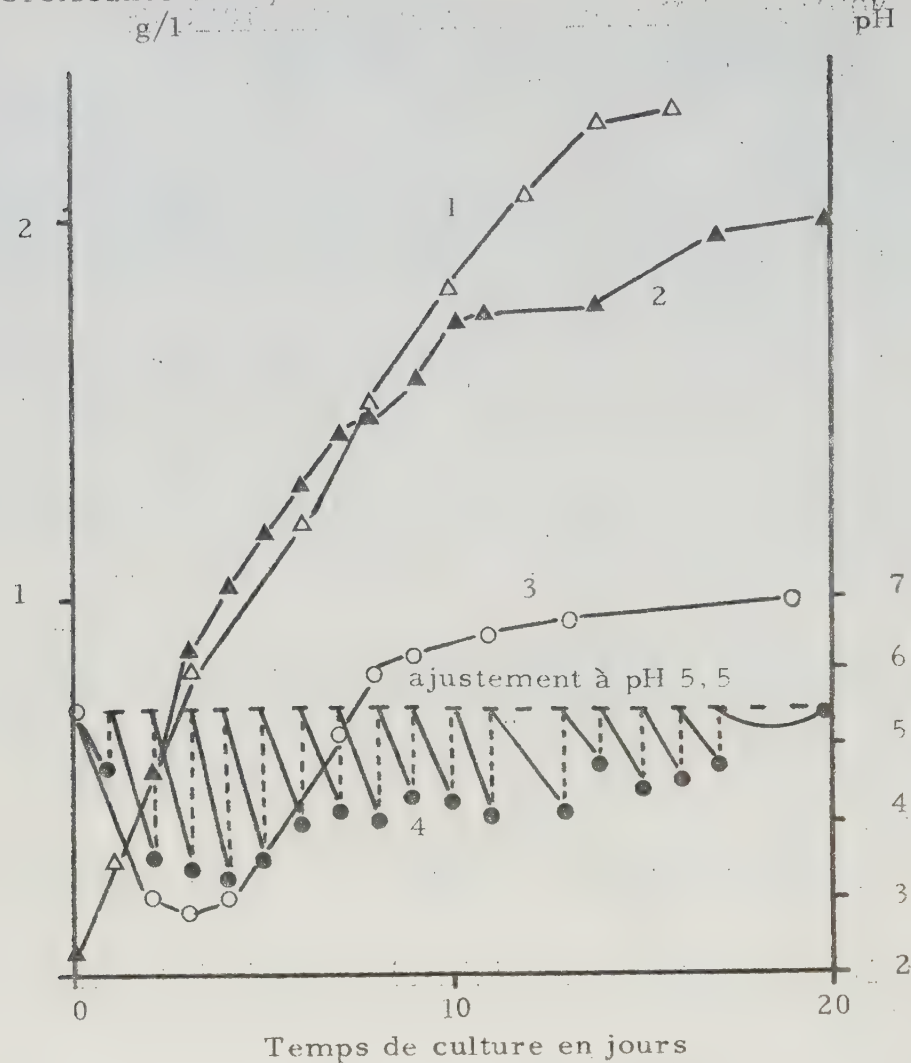
Dans ces expériences, le pH est réajusté quotidiennement à la valeur 5,5 à l'aide d'une solution d'ammoniaque stérile 0,286 N puisque c'est la disparition des ions ammonium qui est à l'origine de l'acidification.

Cette opération s'est poursuivie pendant 17 jours.

B/ Résultats et discussion (graphiques n°25 et 26)

L'addition d'ammoniaque dans la culture semble avoir un effet rétroactif sur le pH (graphique n°23, courbe 4). En effet : dans une culture témoin, après consommation de l'ammonium, et acidification du pH, celui-ci tend vers la neutralité. Dans les expériences présentes, après chaque addition d'ammoniaque pour réajuster le pH à 5,5, le milieu s'acidifie à nouveau. Ce n'est qu'après avoir cessé la modification artificielle du pH, que celui-ci tend lentement vers la neutralité (20ème jour).

Croissance du mycelium

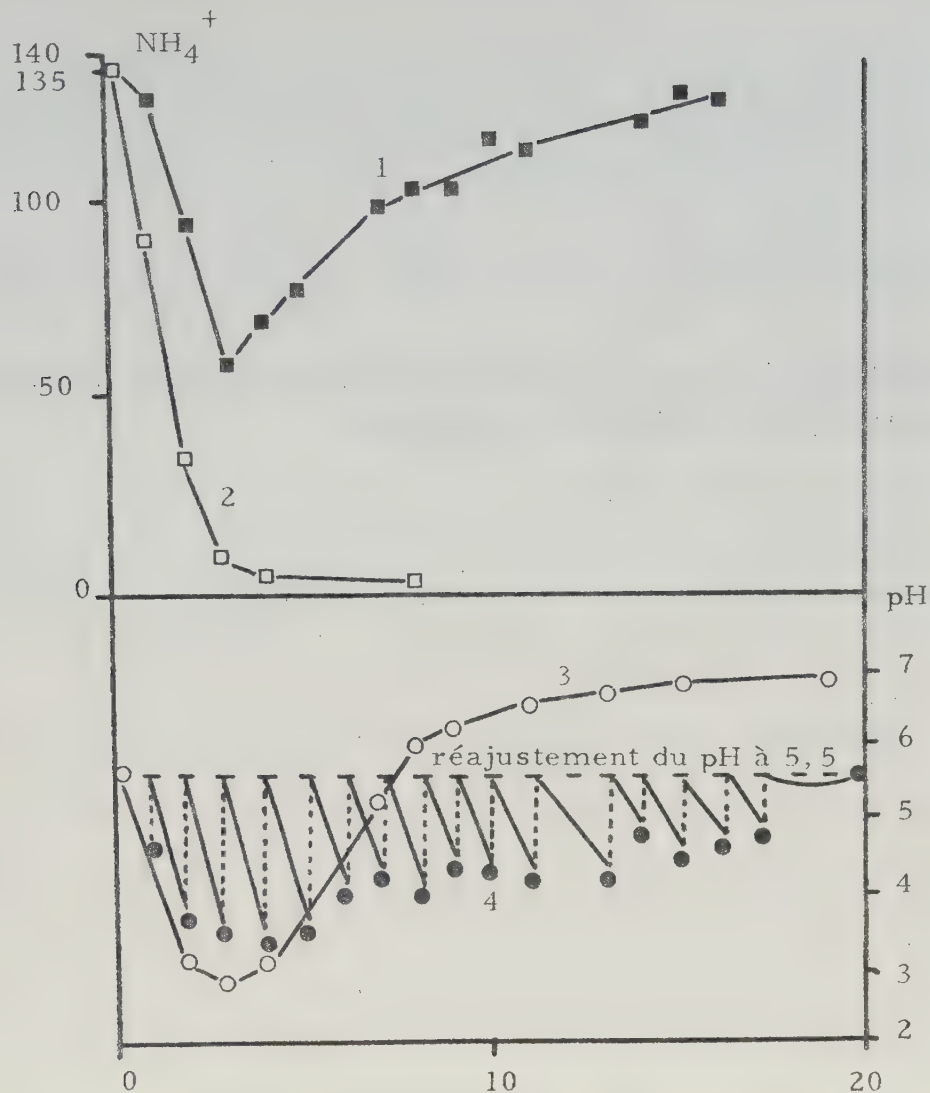


Modification du milieu de culture de *T. viride* en cours de croissance par réajustement du pH pendant une période prolongée, à la valeur initiale 5,5 avec de l'ammoniaque 0,286 N. Cinétique de croissance du mycelium et évolution du pH pendant la culture (concentration en cellulose dans la culture 25 g/l)

- 1 $\Delta-\Delta$ cinétique de croissance du mycelium dans la culture témoin
- 2 $\blacktriangle-\blacktriangle$ " " " " " " " " l'essai
- 3 $\circ-\circ$ évolution du pH dans la culture témoin
- 4 { $\bullet-\bullet$ valeurs du pH trouvées quotidiennement dans l'essai
- 4 { $\bullet-\bullet$ chute du pH entre deux mesures, dans l'essai
- 4 { $-----$ réajustement du pH à la valeur initiale 5,5 dans l'essai

GRAPHIQUE 26

Consommation des ions
ammonium : mg/l



Temps de culture en jours.

Modification du milieu de culture de *T. viride* en cours de croissance par réajustement du pH à sa valeur initiale 5,5 avec NH_4OH : 0,286
Evolution du pH et cinétique de consommation des ions ammonium.

- 1 ■—■ consommation des ions ammonium dans la culture témoin
- 2 □—□ " " " " l'essai
- 3 ○—○ évolution du pH dans la culture témoin
- 4 { ●—● valeurs du pH trouvées à chaque mesure dans l'essai
- chute du pH entre 2 mesures dans l'essai
- - - - - réajustement du pH à la valeur initiale 5,5 dans l'essai

D'autre part, la quantité d'ions ammonium utilisée par le mycelium étant plus importante que dans le témoin - le bilan de la disparition étant de 580 mg - la croissance du champignon est cependant légèrement inférieure à celle du témoin.

Nous avons pensé que la modification artificielle du milieu était effectuée pendant une période trop prolongée, c'est pourquoi nous avons réalisé l'expérience suivante.

III - REAJUSTEMENT DU pH A SA VALEUR INITIALE PENDANT LA PERIODE D'ACIDIFICATION NATURELLE DU MILIEU.

A/ Conditions opératoires

Cette expérience est réalisée dans les mêmes conditions que la précédente, mais le pH n'est réajusté que pendant les cinq premiers jours car nous avons pensé que si nous cessions l'addition d'ammoniaque à cet instant, le pH serait susceptible de tendre alors librement vers la neutralité comme dans le témoin.

Remarque : la normalité de l'ammoniaque est 0,286.

B/ Résultats et discussion (graphique n° 27 et 28)

Les effets observés sont identiques aux précédents. Cependant, le pH se stabilise dans ce cas à la valeur 3 et ne tend pas vers la neutralité (graphique n°28, courbe 4). L'inhibition de la croissance est plus marquée que dans le cas précédent (graphique 27 et 28)). Le bilan de la consommation des ions ammonium, (environ 400 mg/l), est encore beaucoup plus important que dans le témoin (133 mg/l).

C/ Conclusions :

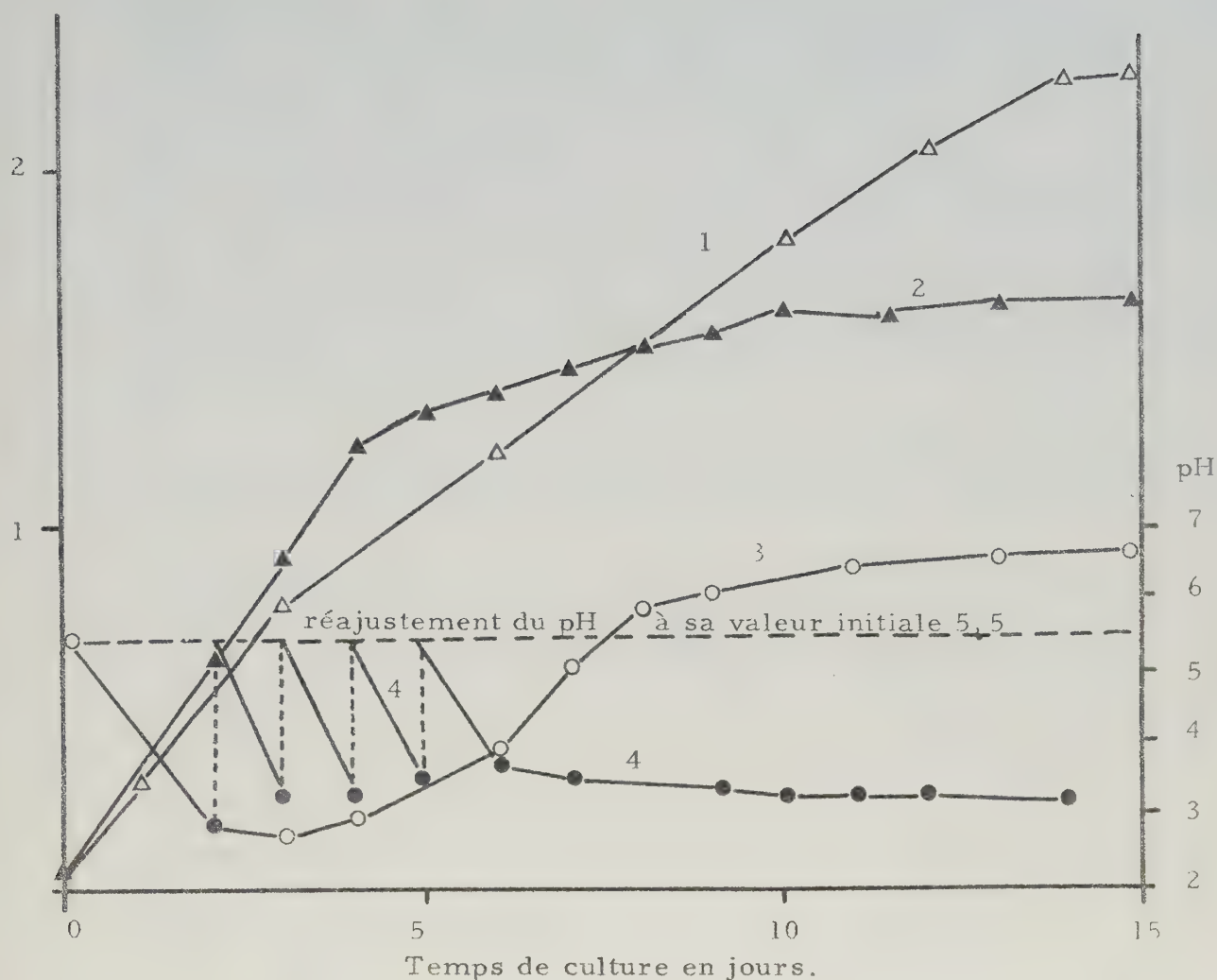
D'après les deux séries d'expériences que nous venons de décrire, il semblerait que l'acidification du milieu de culture en cours de croissance soit nécessaire à un bon développement du mycelium.

Remarques :

Nous n'avons pas effectué d'expériences semblables avec de la soude ou de la potasse, mais il est possible que les effets soient différents de ceux que nous venons d'observer.

GRAPHIQUE 27

Croissance du
mycelium : g/l

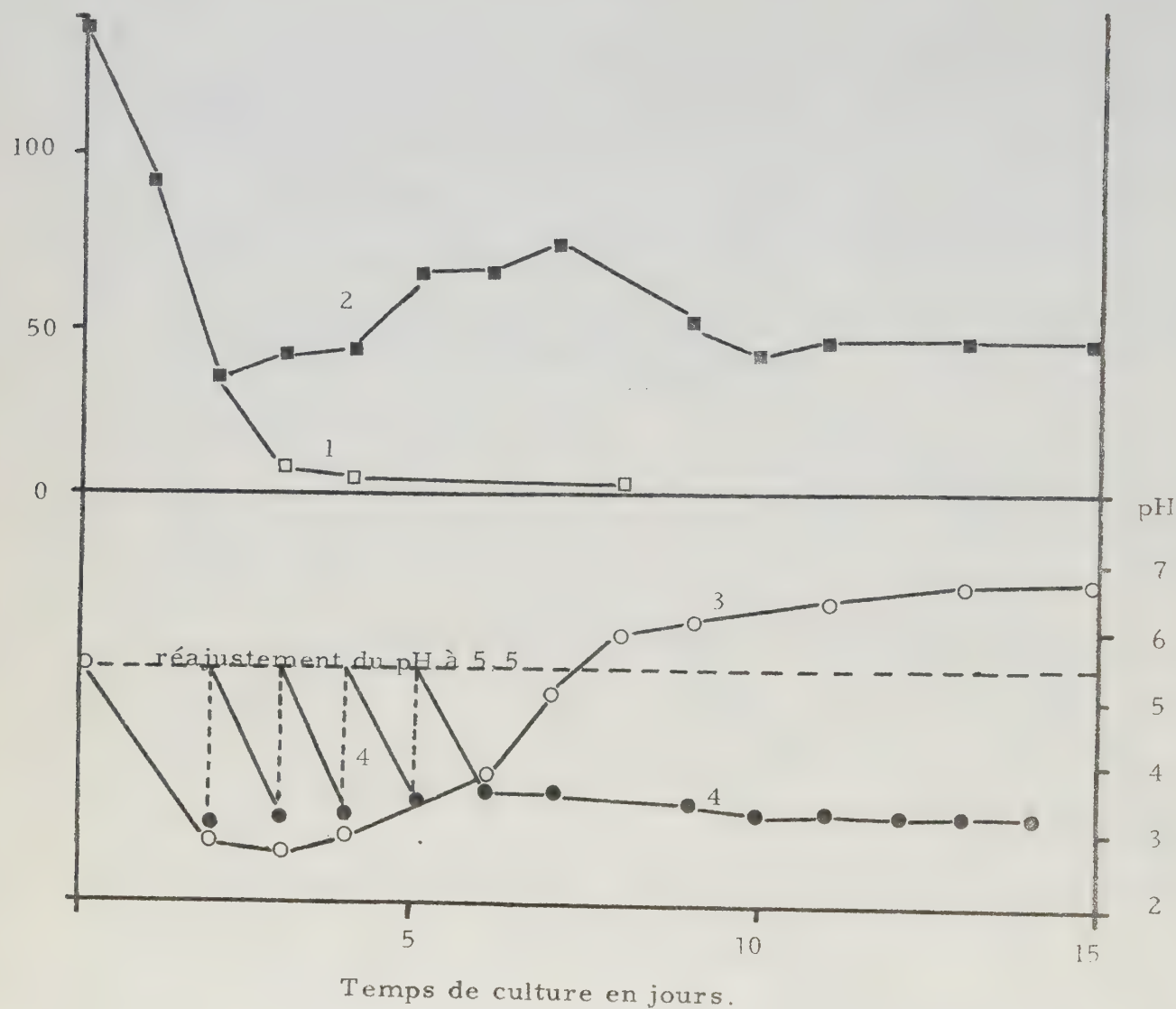


Modification du milieu de culture de *T. viride* en cours de croissance, par réajustement du pH pendant la période d'acidification naturelle (5 premiers jours), à sa valeur initiale 5,5 avec de l'ammoniaque 0,286 N

Cinétique de croissance du mycelium - Evolution du pH pendant la culture.

- 1 $\Delta-\Delta$ Cinétique de croissance du mycelium dans la culture témoin.
- 2 $\blacktriangle-\blacktriangle$ " " " " l'essai
- 3 $\circ-\circ$ Evolution du pH dans la culture témoin
- 4 $\bullet-\bullet$ Valeurs du pH trouvées dans l'essai
- 4 $\diagdown$ Chute du pH entre deux mesures, dans l'essai
- 4 $----$ Réajustement du pH à la valeur initiale 5,5 dans l'essai

Concentration des ions
ammonium dans les
cultures mg/l



Modification du milieu de culture de *T. viride* en cours de croissance, par réajustement du pH pendant la période d'acidification naturelle (5 premiers jours) à sa valeur initiale 5,5, avec de l'ammoniaque 0,286 N.
Evolution du pH et cinétique de consommation des ions ammonium.

- 1 □—□ consommation des ions ammonium dans la culture témoin
- 2 ■—■ " " " l'essai
- 3 ○—○ évolution du pH dans la culture témoin.
- 4 { ●—● valeurs du pH dans l'essai
- { ●—● chute du pH dans l'essai, entre deux mesures
- { ---- réajustement du pH à sa valeur initiale 5,5 dans l'essai.

IV - AJUSTEMENT DU pH A UNE VALEUR PROCHE DU pH DE FIN DE CULTURE APRES LA PERIODE D'ACIDIFICATION NATURELLE DU MILIEU

A/ INTRODUCTION ET CONDITIONS OPERATOIRES :

Comme nous venons de le voir, le réajustement du pH à la valeur initiale dès le premier jour d'incubation, inhibe la culture. Il semble donc que l'acidification du milieu soit nécessaire au développement de T. viride. C'est pourquoi, nous avons modifié l'évolution du pH après l'acidification naturelle, au quatrième jour, par ajustement du pH à une valeur proche de celle de fin de culture, en espérant réduire la période d'auto-neutralisation du milieu.

Les expériences que nous allons décrire ont été effectuées sur cellulose Solka Floc et sur rafles de maïs, dans les conditions que nous avons décrites au chapitre V.

Technique : Pour chaque substrat cellulosique, cinq cultures sont incubées, dans lesquelles le pH initial est 5,5. Sur des prélèvements de 10 ml, le pH est mesuré dès le premier jour. Après avoir observé l'acidification normale et dès que le pH amorce la remontée, celui-ci est ajusté sur les fractions aliquotes, à la valeur 6,3 dans le cas des cultures sur cellulose Solka Floc, et 6,2 dans le cas des cultures sur rafles de maïs, avec des solutions alcalines 0,1N différentes pour chaque essai. Après avoir déterminé les quantités ainsi rajoutées, nous effectuons une transposition à l'échelle des cultures, dans lesquelles les solutions alcalines normales correspondantes sont additionnées de la manière suivante:

Essais I : Cultures témoins sur cellulose et sur rafles de maïs.

Essais 2 : le pH a été ajusté à 6,3 dans la culture sur cellulose et 6,2 dans la culture sur rafles de maïs, avec une solution normale de soude.

Essais 3 : le pH est ajusté de la même manière, mais avec une solution normale de Potasse, seulement dans une culture sur cellulose Solka Floc.

Essais 4 : le pH est ajusté dans les cultures sur cellulose et sur rafles de maïs avec une solution normale d'ammoniaque.

Essais 5 : le pH est ajusté dans les cultures sur cellulose et sur rafles de maïs, avec un mélange normal de soude et de potasse dans lequel le rapport sodium est égal à 15.
potassium

Remarques :

- L'addition de soude ou de potasse dans le milieu détruit l'équilibre du rapport sodium ^{potassium}, c'est pourquoi nous avons réalisé les essais 5, dans lesquels ce rapport est conservé.

- Les volumes des solutions alcalines ajoutées sont de l'ordre de 8 ml. Ils varient sensiblement selon les expériences.

B/ RESULTATS ET DISCUSSIONS : (Graphiques n°29,30,31,32,33,34).

1) - Etude du pH (graphiques n° 29 et 30)

Après l'addition des solutions alcalines, le pH évolue différemment selon les essais.

a) Dans les essais 2 (addition de soude) et 5 (addition du mélange soude-potasse), il évolue lentement vers des paliers supérieurs à ceux des témoins.

- Culture sur cellulose : Palier du pH du témoin : 6,6-6,7

Palier du pH des essais 2 et 5 : 7

- Cultures sur rafles de maïs :

Palier du pH du témoin : 6,2 - 6,3

Palier du pH des essais 2 et 5 : 6,8

b) Dans les essais 4, l'addition d'ammoniaque dans les cultures sur cellulose et sur rafles de maïs, a pour effet de provoquer une nouvelle acidification qui peut être due à une nouvelle consommation des ions ammonium. Nous n'avons pas vérifié cette hypothèse mais nous pouvons la suggérer puisque nous avons vu plus haut que l'acidification du milieu était due pour 95 %, à la disparition de ces ions. Nous remarquons d'autre part, que la nouvelle acidification dans les cultures sur cellulose Solka Floc, comporte approximativement le même nombre d'unité de pH que la première : environ 2,5 (graphique 32, courbe 6). Cependant, dans les cultures sur rafles de maïs, la seconde acidification est moins importante que la première. Les paliers du pH, dans ces essais, correspondent à ceux des témoins aussi bien pour les cultures sur cellulose Solka Floc, que pour les cultures sur rafles de maïs.

c) Le palier du pH, dans l'essai 3 (addition de potasse), effectué seulement sur cellulose, et dont la valeur est 6,8, est très proche de celui de la culture témoin : 6,6-6,7.

2) - Etude de la croissance du mycelium (graphiques n° 29 et 30)

a) - Cultures effectuées sur cellulose Solka Floc (graphique n° 29)

Dès l'addition des solutions alcalines, nous notons

des différences dans le développement des cultures : alors que l'essai 3 (addition de potasse) est très peu influencé, même légèrement inhibé, les cultures 2, 4 et 5 (addition de soude, d'ammoniaque, du mélange soude-potasse) sont stimulées, plus efficacement dans les deux premières, pour atteindre plus de 3 g/l en poids sec de mycelium dans l'essai 4 (addition d'ammoniaque).

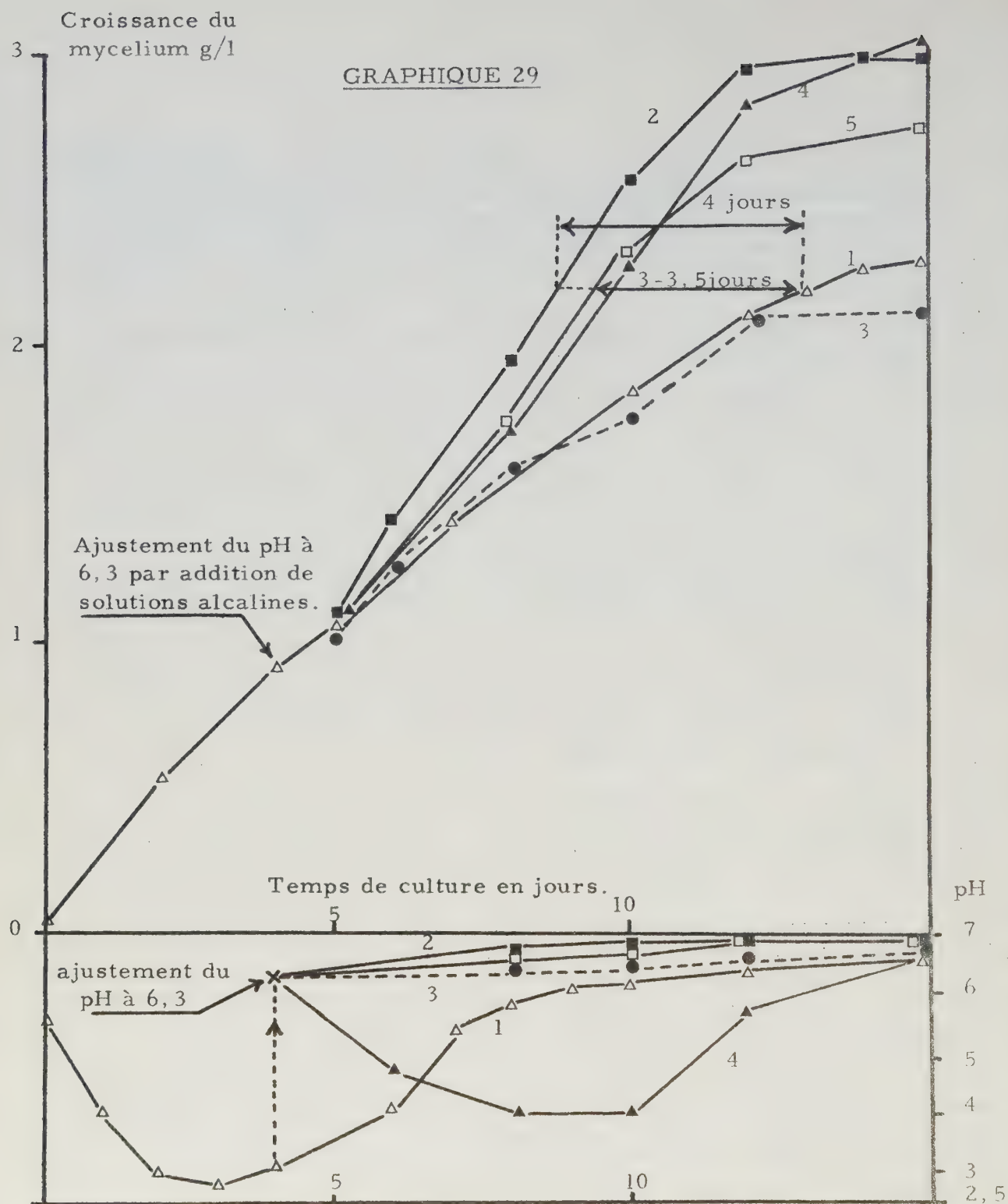
Les pourcentages d'amélioration des différents essais sont les suivants :

- Essai 2 (addition de soude) : + 34%
- Essai 4 (addition d'ammoniaque) : + 36,5 %
- Essai 5 (addition du mélange soude-potasse) = + 20%

Nous remarquons en outre, que la valeur du palier du témoin, 2,2 g/l est atteinte quatre jours plus tôt dans l'essai 2 et environ 3 jours plus tôt dans les essais 4 et 5, où les vitesses de croissance, c'est-à-dire les pentes des courbes, sont plus élevées. Nous avons calculé les vitesses relatives de croissance, ou rendement journalier relatif, entre les 7ème et 10ème jours, par rapport à celle du témoin prise comme unité. Les valeurs obtenues figurent dans le tableau n°19 ci-dessous, dans lequel sont mentionnés aussi les pourcentages d'amélioration de la production du mycelium.

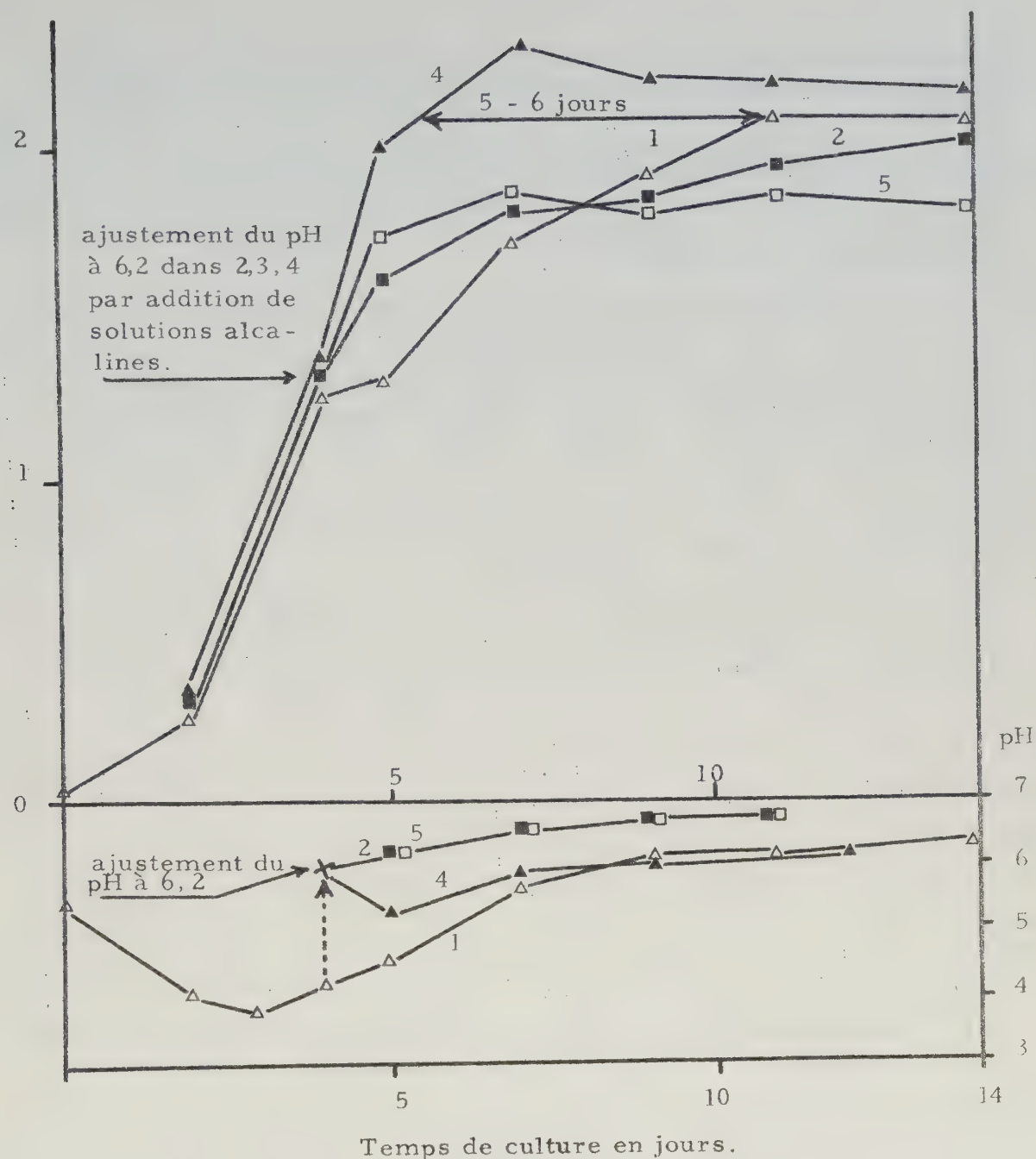
TABLEAU N°19 : Vitesses de croissance relatives, ou rendement journalier, entre les 7ème et 10ème jour, dans des cultures sur cellulose Solka Floc, ajustées à pH 6,3 par addition de soude (2) de potasse (3) d'ammoniaque (4) et d'un mélange soude-potasse (5), après la période d'acidification naturelle. Pourcentage d'amélioration du taux du mycelium en fin de croissance (15ème jour).			
ESSAIS	Vitesse de croissance relative entre les 7ème et 10ème jours.	% d'amélioration du taux de mycelium en fin de croissance.	
1. Témoin	1	0	
2. Addition Na ⁺	2	+ 34	
3. Addition K ⁺	0,7 - 0,8	- 5	
4. Addition NH ₄ ⁺	1,68	+ 36,5	
5. Addition K ⁺ +Na ⁺	1,77	+ 20	

Remarque : Nous avons évalué le pourcentage de perte de poids de la cellulose dans les différents essais, mais les variations observées sont peu sensibles par rapport à celles obtenues pour la croissance du mycelium. Ce fait



Culture sur cellulose Solka Floc à 25 g/l. Ajustement du pH à la valeur 6,3 après la période d'acidification naturelle (4ème jour) à l'aide de solutions alcalines normales. Etude de la croissance du mycelium et évolution du pH.

1 Δ — Δ culture témoin. 2 $\blacksquare$ — $\blacksquare$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de la soude N. 3 $\bullet$ — $\bullet$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de la potasse N. 4 $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de l'ammoniaque N. 5 $\square$ — $\square$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec un mélange N soude et potasse dans lequel $\frac{Na}{K} = 15$



Cultures sur rafles de maïs à 25 g/l

Modification du milieu de culture par ajustement du pH, après la période d'acidification naturelle, à la valeur 6,2 proche de la valeur finale, par addition de solutions alcalines.

Etude de la croissance du mycelium et de l'évolution du pH.

1 Δ — Δ culture témoin. 2 $\blacksquare$ — $\blacksquare$ culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition de soude N. 4 $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition d'ammoniaque N. 5 $\square$ — $\square$ culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition d'un mélange normal de soude et de potasse dans lequel $\frac{Na}{K} = 15$

nous amène à penser que dans les essais, l'utilisation par T. viride de la cellulose rendue soluble par l'attaque des cellulases qu'il libère, est meilleure que dans le témoin. Ce fait indique un rendement énergétique meilleur, que nous pouvons traduire par le rapport entre le taux de mycelium en g/l et la quantité de cellulose dégradée en g/l, en fin de culture. Les différents résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau n°20 ci-dessous :

TABLEAU n°20					
1)	Taux de mycelium en fin de culture (15ème jour) :	MI5			
2)	Pourcentage d'amélioration du taux de mycelium 15ème jour.:				
3)	Quantité de cellulose dégradée 15ème jour :	CD 15			
4)	Pourcentage d'amélioration du taux de cellulose dégradée (15ème jour)				
5)	Rendement énergétique	$\frac{M\ 15}{CD\ 15} \times 100$			
ESSAIS :	MI5 g/l	Accroissement du taux de mycelium au 15 ^e jour %	CD 15 g/l	Accroissement du taux de cellulose dégradée (15 ^e jour) %	Rendement énergétique $\frac{M\ 15}{CD\ 15} \times 100$
I-Témoin :	2,2	0	17,5	0	12,57
2- + Na OH :	2,95	+34	18,2	4	16,4
3- + KOH :	2,1	- 5			
4- +NH ₄ OH :	3,0	+36,6	19,25	10	15
5- + NaOH :	2,65	+20,5	18	3	14,9
+ KOH :					

b) Cultures effectuées sur rafles de maïs : (graphique n°30)

La croissance optimum est obtenue dans l'essai 4 où le pH a été ajusté à 6,2 avec de l'ammoniaque. En effet, dès l'addition de cette solution alcaline (4ème jour), la vitesse de croissance est supérieure à celle du témoin et des autres essais, et le taux maximum de mycelium (2,3 g/l) est atteint au 7ème jour alors que le palier du témoin (2,05 g/l) est atteint vers les onzième jour. L'amélioration du taux de mycelium n'est que de 10%, mais les résultats obtenus permettent de réduire le temps de culture de quatre jours, en ajustant le pH à 6,2 par addition d'ammoniaque dans les conditions que nous avons décrites.

Remarque : La croissance du mycelium dans les essais 2 (addition de soude) et 5 (addition de mélange soude-potasse) est

très peu différente de celle observée dans le témoin, et aucune amélioration n'est observée contrairement aux résultats obtenus dans les cultures sur cellulose.

3)- Activité cellulolytique libérée dans les cultures :
(graphiques n°31, 32, 33, 34)

a) Cultures sur cellulose Solka Floc (graphiques n°31 et 32.)

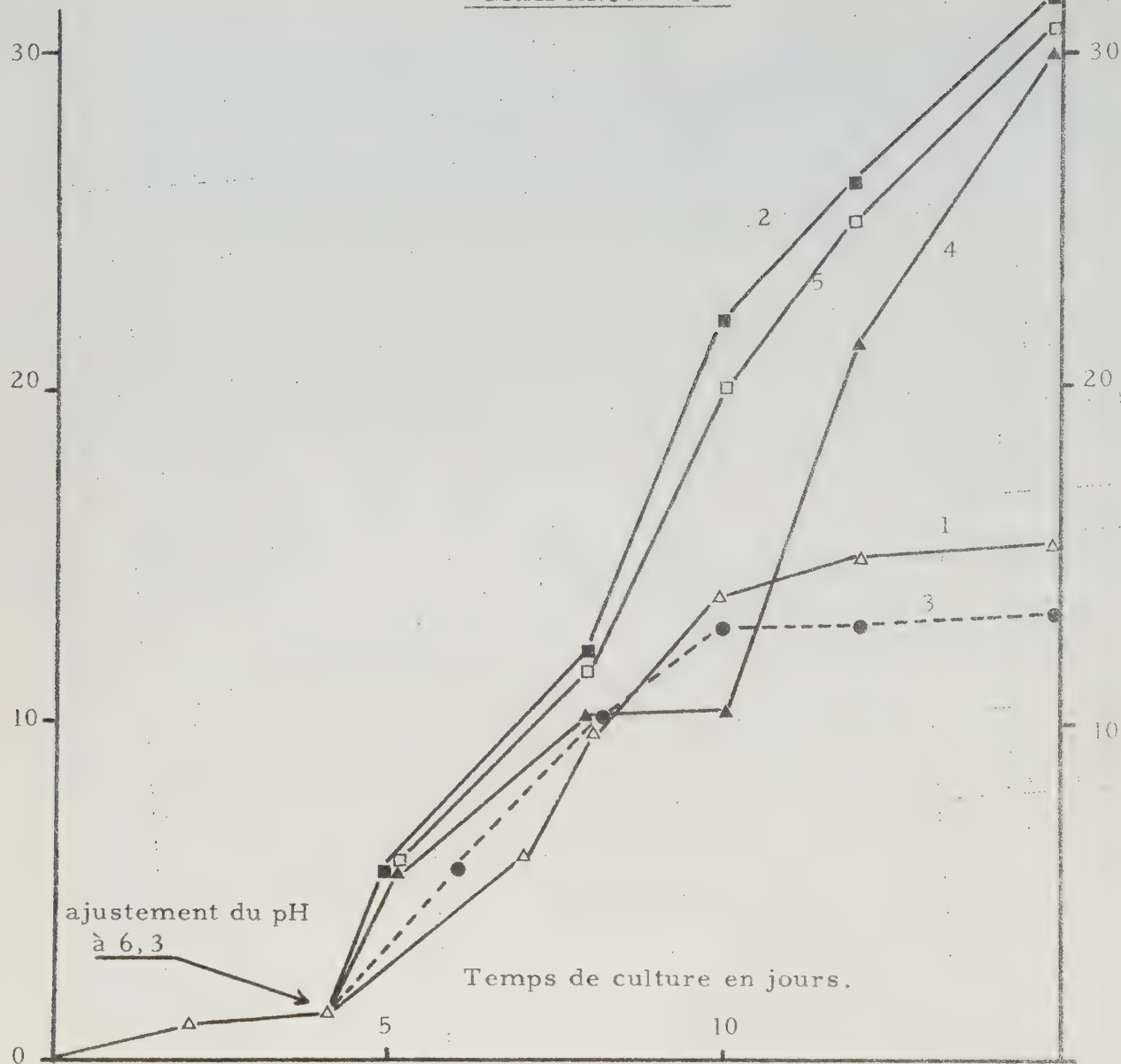
Dans cette étude, nous avons mesuré l'activité cellulolytique des cultures globales et de leurs filtrats, dans les conditions qui ont été déterminées au chapitre I. Comme pour la production de mycelium, les résultats obtenus sont très significatifs. En effet, l'activité cellulolytique a été doublée dans certains essais comme le montre le tableau n°21 ci-dessous :

TABLEAU N°21 - Activité cellulolytique des filtrats en fin de croissance (15ème jour) AFC 15 - Pourcentage d'amélioration de l'activité des filtrats (15ème jour) - Activité cellulolytique des cultures globales en fin de croissance (15ème jour) ACG 15. Pourcentage d'amélioration de l'activité des cultures globales.					
ESSAIS	AFC 15 g glucose par litre.	Pourcentage d'amélioration	ACG 15 g/glucose/l	Pourcentage d'amélioration	
I-témoin	15,3	0	19	0	
2- + NaOH	32	+110	37	+ 94,7	
3- + KOH	13		18		
4- +NH ₄ OH	30	+87,5	32	+ 68,5	
5- (NaOH + KOH)	31	+ 94	36	+ 89,5	

- les effets provoqués par l'addition des solutions alcalines sont immédiats et l'on note sur les graphiques n°31 et 32 une évolution plus rapide de la production des cellulases dans les cultures 2 (addition de soude) et 5 (addition du mélange soude-potasse). C'est ainsi que la valeur du palier de la culture témoin est obtenue deux jours plus tôt dans ces deux essais, pour l'activité des filtrats (graphique n°31), et un jour et demi plus tôt pour l'activité des cultures globales (graphique n°32).

- Dans l'essai 4 (addition d'ammoniaque) nous notons un second palier de la production des cellulases du milieu, que nous avons mis en évidence sur les graphiques n°31 et 32 (courbes N° 4).

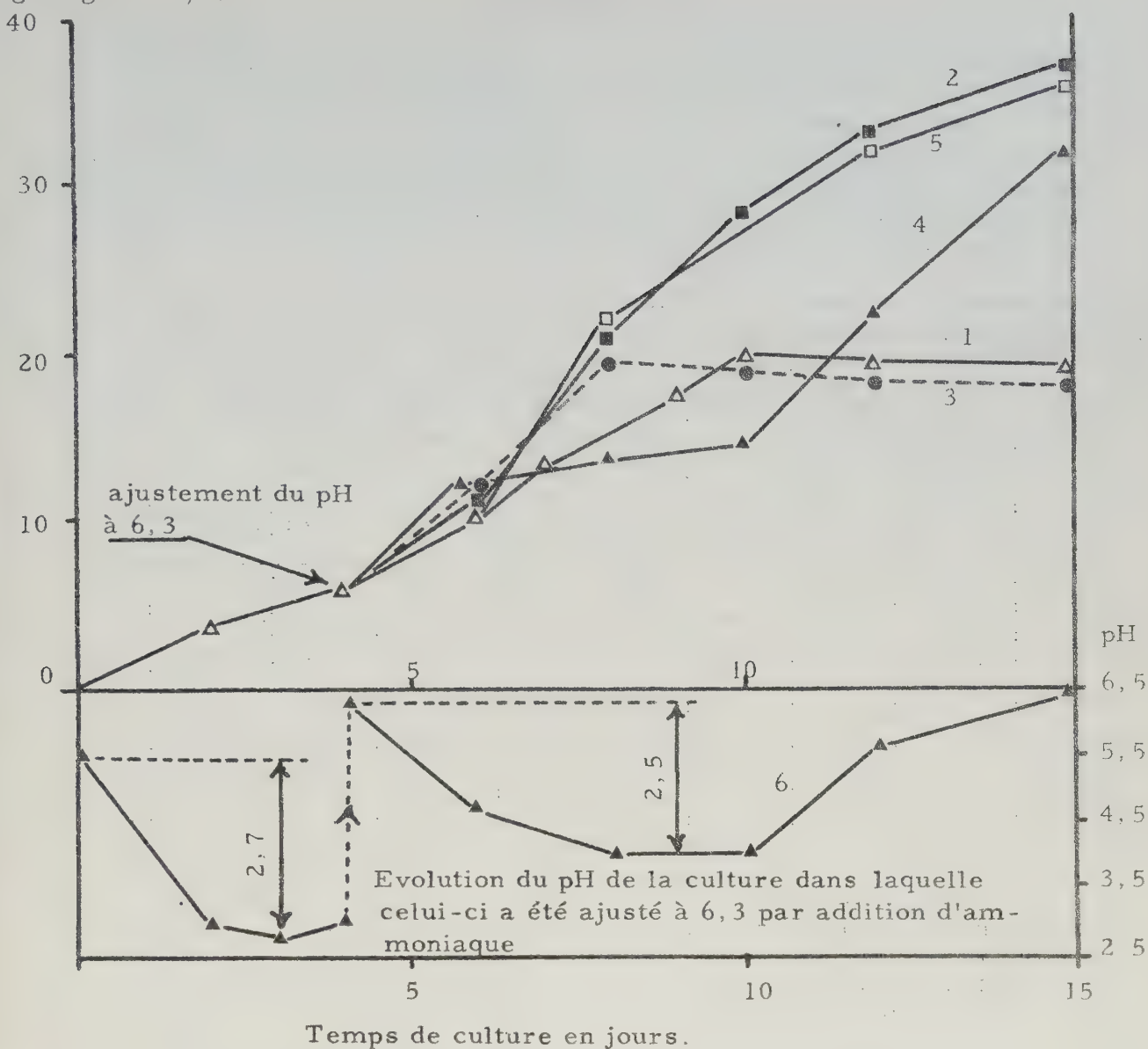
GRAPHIQUE 31



Cultures sur cellulose Solka Floc à 25 g/l. Ajustement du pH à la valeur 6,3 après la période d'acidification naturelle (4e jour) par addition de solutions alcalines normales. Etude de l'activité cellulolytique des filtrats de cultures en g de glucose/l.

1 Δ — Δ culture témoin. 2 $\blacksquare$ — $\blacksquare$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de la soude N. 3 $\bullet$ -- $\bullet$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de la potasse N. 4 $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de l'ammoniaque N. 5 $\square$ — $\square$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec un mélange N soude - potasse, dans lequel Na/K = 15. 6 évolution du pH de l'essai 4 (addition NH_4^+)

GRAPHIQUE 32



Cultures sur cellulose Solka Floc à 25 g/l. - Ajustement du pH à la valeur 6,3 après la période d'acidification naturelle (4e jour) par addition de solutions alcalines normales.

Etude de l'activité cellulolytique des cultures globales, mesurée d'après le pouvoir réducteur libéré et évaluée en g de glucose/l.

1 $\Delta-\Delta$ culture témoin. 2 $\blacksquare-\blacksquare$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de la soude N. 3 $\bullet--\bullet$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de la potasse N. 4 $\blacktriangle-\blacktriangle$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec de l'ammoniaque N. 5 $\square-\square$ culture dont le pH est ajusté à 6,3 avec un mélange normal de soude et potasse, dans lequel $\frac{\text{Na}}{\text{K}} = 15$. 6 $\blacktriangle-\blacktriangle$ évolution du pH de l'essai 4 (pH ajusté à 6,3 avec de l'ammoniaque N).

- Les résultats observés dans l'essai 3 (addition de potasse) sont négatifs et peuvent s'expliquer de la manière suivante : dans les expériences antérieures (chapitre VI,) nous avons vu que le rapport $\frac{\text{sodium}}{\text{potassium}}$ doit être proche de 15 pour obtenir un bon développement de T. viride. Or, le tableau n°22 ci-dessous, traduit la variation de concentration des ions sodium et potassium due à l'addition des solutions alcalines :

: TABLEAU N° 22 : Variations de la concentration des ions so- :
: dium et potassium dans les différents essais, après addition :
: de la soude, de la potasse, ou du mélange soude-potasse.

Essais	Concentration : initiale des : ions Na et K : au temps 0. : mg/l			Quantités : moyennes ra- : joutées au : temps 0,4 : jours mg/l			Concentration : des ions Na : et K au temps : 4 jours mg/l		
	Na	K	$\frac{\text{Na}}{\text{K}}$	Na	K	$\frac{\text{Na}}{\text{K}}$	Na	K	$\frac{\text{Na}}{\text{K}}$
1-témoin	1847	125	14,7	0	0		1847	125	14,7
2- + NaOH	"	"	"	200	0		2047	125	16
3- + KOH	"	"	"	0	350		1847	475	4
5- + NaOH	"	"	"	180	20		2027	145	14
+ KOH	"	"	"	"	"		"	"	"

Nous remarquons que les opérations effectuées dans les différents essais, modifient peu le rapport initial $\frac{\text{Na}}{\text{K}}$, à l'exception de l'essai 3 où ce rapport passe de la valeur 14,7 à la valeur 4, et l'on peut penser que ce fait est à l'origine de la légère inhibition notée dans cet essai.

b) Cultures sur rafles de maïs : (graphiques n°33 et 34)

Dans cette étude, nous avons mesuré l'activité cellulolytique des filtrats de cultures vis-à-vis de la cellulose, et l'activité osidasique des filtrats de cultures vis-à-vis des rafles de maïs.

- Activité des filtrats vis-à-vis de la cellulose : (graphique n°33).

Comme nous l'avons observé dans les cultures réalisées sur la cellulose Solka Floc, l'activité cellulolytique des filtrats progresse beaucoup plus rapidement dans les essais 2 (addition de soude), 4 (addition d'ammoniaque) et 5 (addition du mélange soude-potasse), que dans le témoin, immédiatement après l'addition des solutions alcalines. Cependant, la production maximum des cellulases dans chacun de ces essais est

très peu différente de celle du témoin comme le montre le tableau n°23 ci-dessous :

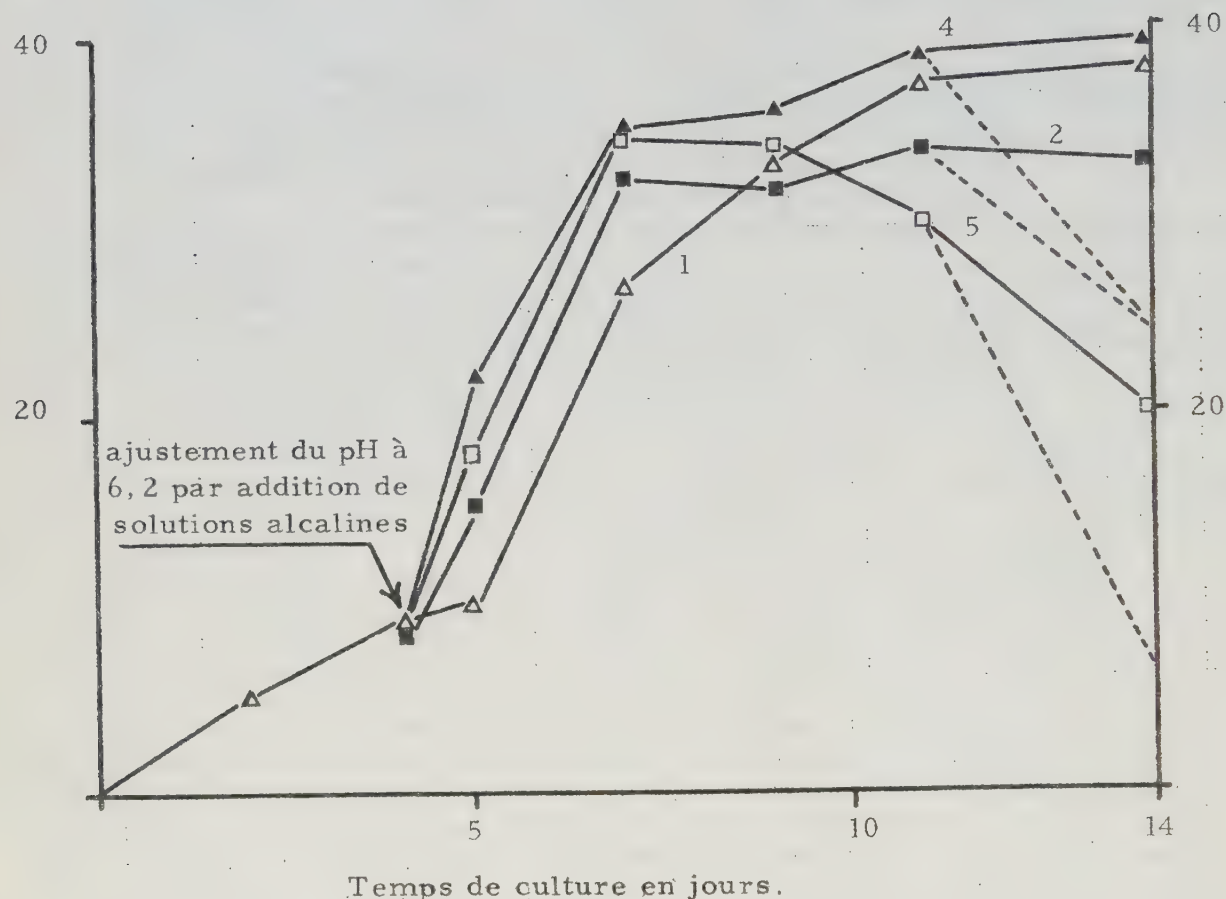
TABLEAU N°23 : Production maximum de cellulases dans les différents essais, et temps d'incubation nécessaire pour l'obtenir. Activité cellulolytique en g.de glucose par litre.			
ESSAIS	Solution alcaline ajoutée au 4ème jour.	Activité cellulolytique maximum en g. de glucose/l.	Temps d'incubation des cultures nécessaires pour obtenir la production maximum de cellulases. Jours
1	Témoin	38	14
2	Soude	34	11
4	Ammoniaque	39,5	11
5	Soude + Potasse	35	7

Si l'activité cellulolytique des filtrats n'a pu être accrue de façon significative, ces expériences ont permis néanmoins de réduire le temps de culture, tout en conservant une activité enzymatique comparable à celle du témoin. En effet, si nous considérons qu'au dixième jour, la valeur de l'activité cellulolytique de la culture témoin (35 g/l) est proche du palier, qui est de 38 g/l, nous l'obtenons au septième jour dans les essais 4 (addition d'ammoniaque) et 5 (addition du mélange soude-potasse), alors que la valeur du pouvoir cellulolytique de la culture témoin n'est à cet instant que de 25 g/l. Le décalage observé est donc de trois jours en faveur des essais 3 et 4. L'ajustement du pH à la valeur finale, par addition d'ammoniaque dans une culture sur rafles de maïs après acidification naturelle du milieu permet donc d'obtenir en sept jours les valeurs maximum de production de mycelium et de cellulases observées après dix jours d'incubation dans une culture témoin.

Remarque : Les productions de cellulases telles que nous venons de les décrire ont été mesurées d'après l'activité cellulolytique déterminée sur la cellulose à 100 g/l après 48 h. de réaction enzymatique. Si nous considérons la courbe n°4 du graphique n°6 (chapitre I), représentant le pourcentage de la réaction enzymatique effectuée avec un filtrat de culture sur rafles de maïs dégradant la cellulose Solka Floc, (la base 100 étant attribuée à la valeur obtenue après 96 heures de réaction), nous pouvons, dans le tableau n° 24 ci-dessous, extrapoler aux différents temps de réaction, les valeurs établies plus haut pour un temps de réaction de 48 heures.

GRAPHIQUE 33

Activité cellulolytique
des filtrats en g de
glucose / l.



Cultures effectuées sur rafles de maïs à 25 g/l

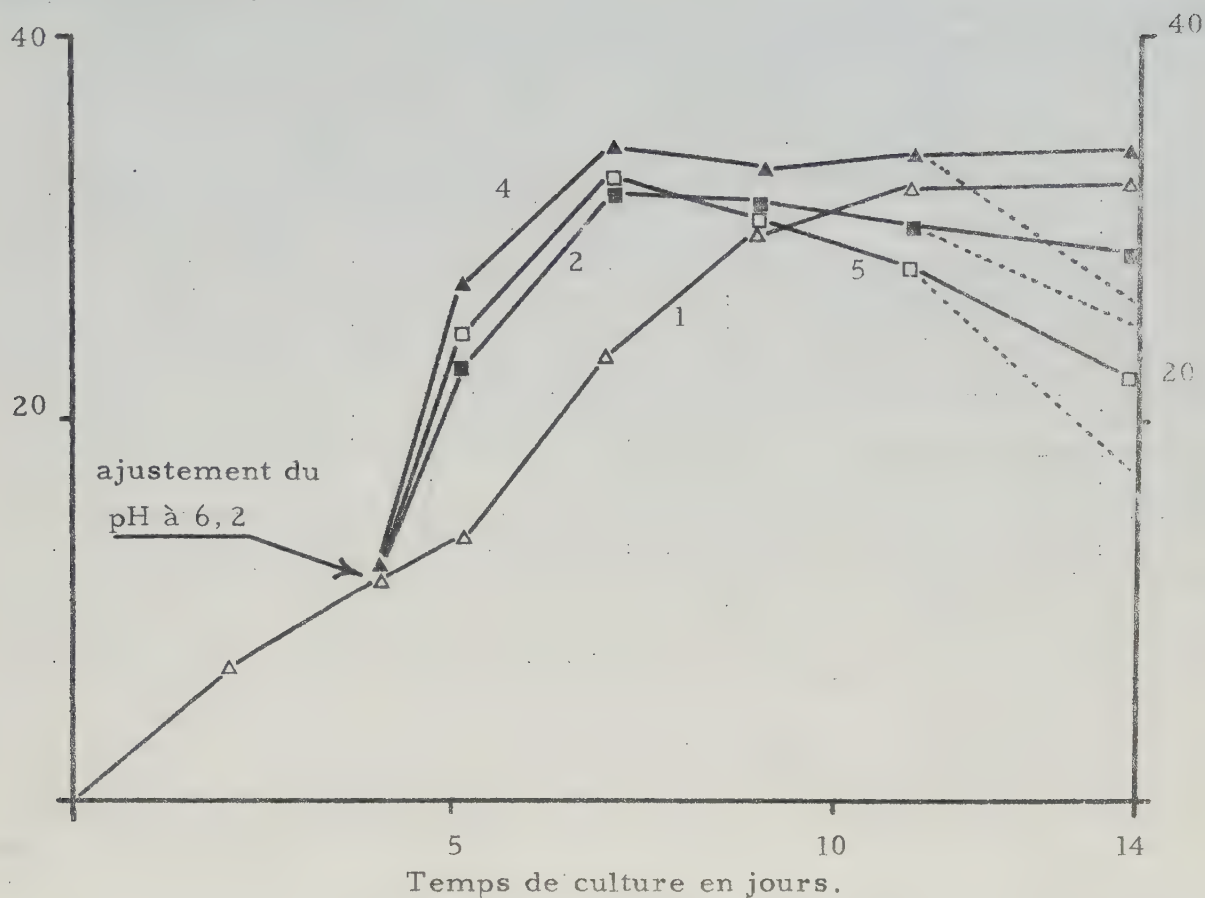
Modification du milieu de culture par ajustement du pH, après la période d'acidification naturelle, à la valeur 6,2, par addition de solutions alcalines (4^e jour)

Cinétique de l'activité cellulolytique des filtrats de culture mesurée sur cellulose Solka Floc à 100 g/l, évaluée d'après le pouvoir réducteur libéré et exprimée en g de glucose par litre.

1. Δ—Δ filtrat de culture témoin. 2. ■—■ filtrat de culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition de NaOH N. 4. ▲—▲ filtrat de culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition de NH_2OH N. 5. □—□ filtrat de culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition d'un mélange soude-potasse dans lequel $\frac{\text{Na}}{\text{K}} = 15$

GRAPHIQUE 34

Activité osidasique des
filtrats en g de glucose/l.



Cultures sur rafles de maïs à 25 g/l.

Modification du milieu de culture en cours de croissance, par ajustement du pH, après la période d'acidification naturelle, à la valeur 6,2 par addition de solutions alcalines.

Cinétique de l'activité osidasique des filtrats de culture mesurée sur rafles de maïs à 100 g/l et évaluée d'après le pouvoir réducteur global libéré et exprimée en g de glucose /l.

- 1 △—△ filtrat de culture témoin.
- 2 ■—■ culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition de soude N
- 4 ▲—▲ culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition d'ammoniaque N
- 5 □—□ culture dont le pH est ajusté à 6,2 par addition d'un mélange normal soude et potasse dans lequel $\frac{\text{Na}}{\text{K}} = 15$

Tableau N° 24 : Activité cellulolytique des filtrats de culture sur rafles de maïs, concernant l'ajustement du pH par des solution alcalines, et mesurée sur cellulose en fonction du temps de réaction enzymatique. La base de 100 est attribuée à l'activité mesurée après 96 heures de réaction.									
Temps de réaction enzymatique	% d'achèvement de la réaction enzymatique (cf. graphique 6, courbe 4)		Activité cellulolytique des filtrats de cultures étudiées après 7 jours d'incubation en g. glucose par litre.		Activité cellulolytique des filtrats de cultures étudiées après 11 jours d'incubation en g. glucose par litre.				
			IT		2 Na		3 NH ₄		
96	100		31,25	41,25	44	44	46,25	50	
72	95		29,8	39,2	41,5	41,5	44	47,5	
48	80		25	33	35	35	37	39,5	
24	65		20,5	26,8	28,5	28,5	30	32,5	

L'activité cellulolytique des cultures sur rafles de maïs a donc été accrue de 40% par rapport à celle du témoin, après une période d'incubation de sept jours, et la valeur obtenue est très appréciable puisque les filtrats de cultures libèrent plus de 40 g/l de sucres réducteurs en trois jours à partir de 100 g. de cellulose Solka Floc.

- Activité osidasique des filtrats vis-à-vis des rafles de maïs. (Graphique n° 34)

La valeur du palier, 31 g/l, observée dans la culture témoin après dix jours d'incubation, est obtenue au sixième jour dans l'essai 4 (addition d'ammoniaque) et entre le sixième et le septième jour dans les deux autres essais (addition de soude, et du mélange soude-potasse). Dans ce cas, le temps d'incubation des cultures peut être ainsi réduit de trois ou quatre jours grâce à l'addition de solutions alcalines.

En extrapolant à différents temps de réaction enzymatiques, entre 24 et 96 heures, les mesures des activités obtenues après 48 heures comme nous l'avons fait précédemment, nous obtenons les valeurs suivantes :

TABLEAU N° 25 : Activité cellulolytique des filtrats des cultures sur rafles de maïs, concernant l'ajustement du pH par des solutions alcalines, et mesurée sur des rafles de maïs, en fonction du temps de réaction enzymatique. La base de 100 est attribuée à un temps de réaction de 96 heures.

Temps de réaction enzymatique	% d'achèvement de la réaction enzymatique (cf. graphique 6, courbe 4)	Activité cellulolytique des filtrats de cultures étudiées vis-à-vis des rafles de maïs, après 7 jours d'incubation en g. de glucose par litre	Activité cellulolytique des filtrats de cultures étudiées vis-à-vis des rafles de maïs, après 11 jours d'incubation. g glucose/l.
		IT : 2(Na) 3(NH ₄) 4(K+Na)	IT : 2(Na) 3(NH ₄) 4(K+Na)
96	100	28,75 : 40 : 42,50 : 41,25 : 38,75	38,12 : 42,50 : 36,5
72	95	27,3 : 38 : 40,38 : 39,2 : 36,8	36,2 : 40,38 : 34,7
48	80	23 : 32 : 34 : 33 : 31	30,5 : 34 : 29
24	65	18,7 : 26 : 27,63 : 26,8 : 25,2	24,7 : 27,63 : 23,7

Remarques :

Si nous superposons les graphiques n°33 et n°34, nous constatons que les courbes représentant les activités cellulolytiques vis-à-vis de la cellulose Solka Floc, et osidasiques vis-à-vis des rafles de maïs, et relatives à chaque essai, se coupent entre les sixième et septième jours d'incubation. Ce phénomène a déjà été mentionné antérieurement (chapitre V). En effet, un filtrat de culture effectuée sur rafles de maïs dégrade mieux ce substrat que la cellulose, pendant les six premiers jours, mais le phénomène est inversé après sept jours d'incubation des cultures.

- Lors de certaines expériences réalisées dans les conditions précédentes, nous avons noté des chutes plus ou moins rapides de la production des cellulases dans les trois essais (2, 4, 5) en fin de cultures (courbes en pointillés sur les graphiques 33 et 34). Ce phénomène peut être attribué à une autolyse précoce des cellules ou à une dégradation des cellulases.

CONCLUSIONS

Les expériences que nous venons de décrire, concernant l'ajustement du pH à la valeur 6,3 par addition de solutions alcalines après la période d'acidification naturelle du milieu de culture, nous ont permis de faire des remarques importantes et de réduire le temps d'incubation des cultures de T. viride. En effet, 7 jours d'incubation sont suffisants, dans les conditions opératoires que nous avons déterminées, pour atteindre simultanément les valeurs maximum de production de mycelium et de cellulases, obtenues dans les cultures témoins après plus de 10 jours d'incubation.

Le tableau récapitulatif suivant n°26 illustre l'importance des résultats obtenus :

TABLEAU No 26 : Amélioration obtenue par la méthode relative à l'ajustement du pH, à la valeur 6,3 pour les cultures sur celluloses (C) et 6,2 pour les cultures sur rafles de maïs (M) par addition de solutions alcalines normales après l'acidification naturelle du milieu.

Etude de la production de mycelium, et de l'activité cellulolytique des filtrats de cultures vis-à-vis de cellulose SOLKA FLOC ou des rafles de maïs à 100 g/l, évaluée d'après le pouvoir réducteur libéré en 96 h, exprimé en g de glucose/l.

C : Activité cellulolytique des filtrats de culture sur cellulose vis-à-vis de la cellulose

MC : " " " rafles de maïs " " "

MM : " " " " " des rafles de maïs.

Production de Mycelium g/l.										Activité cellulolytique des filtrats de culture mesurée après 96 h. de réaction, en g. de glucose/l.									
ESSAIS	Valeur du Palier g/l			Temps de culture nécessaires à l'obtention du palier témoin en jours			Réduction du temps d'incubation des cultures en jours			Valeur du palier g/glucose /l.			Temps de culture nécessaires à l'obtention du palier témoin en jours			Réduction du temps d'incubation des cultures en jours			
	C	M		C	M		C	MC	MM	C	MC	MM	C	MC	MM	C	MC	MM	
1. Témoin	2,3	2,0		14	11		0	0		16	46-47	38,75	12	10-11	11	0	0	0	
2. Addition de soude N	2,95	2		9			5			33	42,5	38	8-9		7	3-4		4	
3. Addition d'ammoniaque N	3	2,2-2,3		10	5-6		4			32	50	42,5	11	7	6-7	1	3-4	4-5	
4. Addition du mélange soude-potasse N	2,1	1,85		10			4			32,5	42,5	36,5	9	7	7	3		4	

CONCLUSIONS GENERALES

Dans l'étude qui précède, nous avons pu mettre en évidence plusieurs faits importants concernant la culture de T. viride sur cellulose de référence :

1° - La concentration du substrat, l'âge de la préculture, la composition du milieu minéral jouent un rôle essentiel dans le développement du mycelium et de l'activité cellulolytique. La culture de T. viride est très sensible à ces facteurs, en effet :

- la concentration optimum de cellulose est comprise entre 25 et 30 g/l,
- l'âge de la préculture doit être compris entre 10 et 12 jours,
- les concentrations relatives des ions sodium et potassium doivent être telles que le rapport $\frac{\text{sodium}}{\text{potassium}}$ soit proche de 15.
- la concentration des ions ammonium doit être faible.

2° - La cinétique de consommation des ions et les mesures de pH nous ont permis de constater que l'ammonium est consommé préférentiellement aux nitrates et ce, après trois jours d'incubation pendant lesquels le pH s'acidifie.

Cette période d'acidification, qui semble due pour 95% à la disparition des ions ammonium, est nécessaire et ne peut être compensée par une addition d'ammoniaque, ayant un effet rétroactif sur le pH, sans provoquer une inhibition de la culture.

Cependant, la période d'autoneutralisation du milieu peut être réduite par l'adjonction de solutions alcalines, mais seulement après l'acidification naturelle du milieu de culture, et de telle sorte que le rapport $\frac{\text{sodium}}{\text{potassium}}$ de la culture soit peu influencé.

La comparaison entre les cultures effectuées sur cellulose SOLKA FLOC et sur rafles de maïs de dimensions semblables, nous a permis de faire des observations très intéressantes :

1° - La production de mycelium semble légèrement inférieure dans les cultures effectuées sur rafles de maïs d'environ 10 %, mais la production de cellulases dans le milieu est beaucoup plus élevée que celle des cultures sur cellulose. En effet :

- un litre de filtrat obtenu à partir d'une culture témoin de T. viride sur rafles de maïs, contient 0,65 g. de

protéines et libère en 96 heures environ 50 g. de sucres réducteurs évalués en glucose, à partir de 100 g. de cellulose SOLKA FLOC.

- un litre de filtrat provenant d'une culture témoin réalisée sur cellulose SOLKA FLOC, contient 0,21 g. de protéines et libère en 96 heures environ 16 g. de sucres réducteurs évalués en glucose, à partir de 100 g. de cellulose.

2° - Les filtrats obtenus à partir de cultures sur cellulose ou sur rafles de maïs, ont des effets croisés envers ces deux substrats : ainsi le filtrat de culture sur cellulose Solka Floc dégrade mieux les rafles de maïs, tandis que le phénomène inverse est observé pour le filtrat de culture sur rafles de maïs.

Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les rafles de maïs constituent un substrat contenant diverses substances stimulant la production ou l'action des cellulases par T. viride, mais qu'elles contiennent moins de cellulose que la cellulose de référence.

Des résultats directement applicables ont été obtenus :

- le temps nécessaire à l'obtention du palier de production du mycelium, étant de 14 jours pour la culture témoin sur cellulose et de 11 jours pour la culture témoin sur rafles de maïs, a été réduit :

- de 4 à 5 jours dans le cas de cultures effectuées sur cellulose par addition de solutions normales de soude, d'ammoniaque, d'un mélange soude-potasse, après acidification naturelle du milieu et de manière à ajuster le pH à une valeur proche de celle observée en fin de culture,

- de 5 à 6 jours dans le cas des cultures effectuées sur rafles de maïs par addition d'une solution normale d'ammoniaque dans les mêmes conditions que précédemment.

- le temps d'incubation nécessaire à l'obtention du palier de production des cellulases, étant de 12 jours pour la culture témoin sur cellulose et de 10-11 jours pour la culture témoin sur rafles de maïs a été réduit :

- de 3 à 4 jours dans le cas des cultures effectuées sur cellulose, par addition de solutions normales de soude et d'un mélange soude-potasse dans les conditions que nous avons décrites,

- de 3 à 4 jours dans le cas des cultures effectuées sur rafles de maïs, par addition d'une solution d'ammoniaque dans les mêmes conditions.

- L'action sur cellulose SOLKA FLOC ou sur rafles de maïs, des filtrats de cultures réalisées dans les conditions que nous venons de décrire, a permis d'obtenir des solutions

sucrées très concentrées pouvant servir de milieu nutritif pour d'autres microorganismes. Ainsi :

- La conversion de 100 g. de cellulose par un litre de filtrat d'une culture effectuée sur rafles de maïs en utilisant la méthode d'addition d'ammoniaque, fournit en 4 jours 53 g. de sucres réducteurs, en tenant compte de la quantité provenant de la dégradation des rafles pendant la culture, dont 42,5 g. de glucose, 5 g. de xylose, 7 g. de cellobiose.

- La conversion de 100 g. de rafles de maïs, considérées comme déchets cellulosiques, par un litre du même filtrat, produit 45 g. de sucres réducteurs, compte tenu de la quantité libérée pendant la culture, dont 36 g. de glucose et 10 g. de xylose.

- D'autre part, la quantité de mycelium obtenue, 2,3 g/l après 7 jours d'incubation des cultures de T. viride effectuées sur rafles de maïs, en utilisant la méthode d'addition d'ammoniaque^{que}/nous avons décrite, peut constituer un supplément azoté en étant incorporé dans la nourriture des animaux comme adjuvant.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) R.A. AITKEN, B.P. EDDY, M. INGRAM et C. WEURMAN,
Biochem, J. 1956, 64, 63-70.
- (2) BARKER, Rev. Appl. Mycol. 1940, 19, 538, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths, 1960, 232.
- (3) A. BARY (de), Botan. Z. 1886, 44, 377-474, in
E.B. COWLING, Structural features of cellulose
that influence its susceptibility to enzymatic
hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of
cellulose and related materials, Pergamon
Press, 1963, 2.
- (4) J.L. BRYSON et H.K. MITCHELL, Nature, 1951, 167, 864
- (5) CHANCE, PERKERSON et Mc.MILLEN, Text. Res. J. 1959,
29, 558.
- (6) CLAYSON, J. Soc. chem. Ind. London, 1943, 62, 49.
- (7) COMPTON, Text. Res. J. 1957, 27, 222.
- (8) J. COTTE et E. KAHANE, Bull. Soc. chim. 1946, 542 M.
- (9) E.B. COWLING, Structural features of cellulose that
influence its susceptibility to enzymatic hydrolysis ;
in E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis
of cellulose and related materials, Pergamon
Press, 1963, 12.
- (10) E.B. COWLING, Technical Bull. No. 1258, December, 74 pp,
in E.B. COWLING, Structural features of cellu-
lose that influence its susceptibility to enzy-
matic hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of
cellulose and related materials, Pergamon Press
1963, 11.
- (11) DOREE, Biochem. J. 1920, 14, 559.
- (12) FALCK et HAAG, Ber. 1927, 60, 225 in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths, 1960, 44.

- (13) W.P.K. FINDLAY, Ann. Bot. 1934, 48, 109-117 in
E.B. COWLING, Structural features of cellulose
that influence its susceptibility to enzymatic
hydrolysis in
E.T. REESE, Enzymic hydrolysis of cellulose and
related materials, Pergamon Press, 1963, 27.
- (14) J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cel-
lulose, Butterworths, 1960, 53-68, 76, 77-119, 234-5
- (15) J.R. GEIGY, Documenta Geigy, Memento scientifique
J.R. GEIGY, 1956, (5è.ed) 101
- (16) W. GILLIGAN et E.T. REESE, Canad. J. Microbiol. 1954,
1, 90-107
- (17) GOLDTHWAIT, BURAS et COOPER, Text. Res. J. 1951, 21, 831.
- (18) W. GRASSMAN, L. ZECHMEISTER, L. TOTH et R. STADLER,
Ann. 1933, 503, 167-179, in
- (19) H.C. HAGEDORN et B.N. JENSEN, Biochem. Z. 1923, 135, 46.
- (20) G. HALLIVELL, Biochem. J. 1961, 79, 185-192
- (21) E. HANSTEIN, Ber. Schweiz. Botan. Ges, 1960, 70, 314-351.
- (22) J.H. HASH et K.W. KING, J. Biol. Chem. 1858, 232, 381-393.
- (23) HASTINGS, Poultry Sci. 1946, 25, 584; in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths, 1960, 240.
- (24) W.C. HESS et M.X. SULLIVAN, Ind. Engng. Chem. (Anal ed),
1945, 17, 717
- (25) HOBART, DRAKE et GUTHRIE, Text. Res. J. 1955, 25, 257.
- (26) HOLMAN et JARRELL, Ind. Engng. Chem. 1923, 15, 236, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths, 1960, 232.
- (27) J. HONEYMAN, Recent Advances in the chemistry of cel-
lulose and Starch, 1959, 464, Interscience, New York; in
E.B. COWLING, Structural features of cellulose
that influence its susceptibility to enzymatic
hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of
cellulose and related materials, Pergamon Press,
1963, 24.

- (28) HOPPE-SEYLER, Ber. 1883, 16, 122, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose Butterworths, 44.
- (29) HUNT et GARRATT, Wood Preservation, 1938, Mac.Graw.Hill,
New York.in,
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of
cellulose, Butterworths, 44.
- (30) M.W. JEFFISON, Physiology of wood-rotting fungi, final
Report No 8, Office Naval Research, Microbiol. Branch,
Syracuse University, Syracuse, N.Y. 1952, 151 pp, in
E.B. COWLING, Structural features of cellulose
that influence its susceptibility to enzymatic
hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of
cellulose and related materials, Pergamon Press,
1963, 27.
- (31) K.W. KING, Va. Agric. Expt. Sta. Tech. Bull. 1961, 154, in
E.B. COWLING, Structural features of cellulose
that influence its susceptibility to enzymatic
hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of
cellulose and related materials, Pergamon Press,
1963, 18.
- (32) J. KJELDAML, Z. anal. Chem. 1883, 22, 366.
- (33) P. KOOLMAN, Enzymologia, 1957, 18, 371-384, in
Y. HASHIMOTO et K. NISIZAWA, Purification of cel-
lulase and related enzymes ; in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cel-
lulose and related materials, Pergamon Press,
1963, 94.
- (34) P. KOOLMAN, P.A. ROELOFSEN et S. SWEERIS, Enzymologia,
1953, 16, 237-246 in
Y. HASHIMOTO et K. NISIZAWA, Purification of cel-
lulase and related enzymes in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cel-
lulose and related materials, Pergamon Press,
1963, 94.
- (35) LOICJANSKAJA, C.R. Acad. Sci. U.R.S.S., 1937, 14, 381.
- (36) LUDTKE, Biochem. Z. 1936, 285, 89, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths, 1960, 44.
- (37) M. MANDELS, G.L. MILLER et R.W. SLATER Jr. Arch. Bio-
chem. Biophys. 1961, 92, 115-121.

- (38) P.B. MARSH, K. BOLLENBACHE, M.L. BUTLER et L.R.L. GUTHRIE, Text. Res. J. 1953, 23, 878-888.
- (39) MARSHALL WARD, Ann. Bot. Lond. 1888, 2, 319 ; in J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cellulose, Butterworths, 1960, 44.
- (40) MARSTON, W.C. REID, STEWART et WOODWARD, A. Survey of Agriculture, Forestry and Fishery products in the U.K. and their utilisation, 1953, HM Stationery office, London, in J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cellulose, Butterworths, 1960, 241.
- (41) MASOERO, UBERTALLE et MALETTTO, Atti. soc. ital. Sci. Vet. 1957, 11, 466 in J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cellulose, Butterworths, 1960, 240
- (42) MESSERLE, Biochem. Z. 1926, 172, 31, in J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cellulose, Butterworths, 1960, 240.
- (43) G.L. MILLER et R. BIRZGALIS, Arch. Biochem. Biophys. 1961, 25, 19-24.
- (44) G.L. MILLER et R. BIRGALIS, J. Chromatog. 1962, 7, 33-38, in Y. HASHIMOTO et K. NISIZAWA, Purification of cellulase and related enzymes, in E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press 1963, 102.
- (45) G.L. MILLER et R. BLUM, J. Biol. Chem. 1956, 218, 131-137.
- (46) G.L. MILLER, R. BLUM et N.F. HAMILTON, J. Chromatog. 1960, 3, 576-581 in Y. HASHIMOTO et K. NISIZAWA, Purification of cellulase and related enzymes, in E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press, 1963, 102.
- (47) K. NISIZAWA et T. KOBAYASHI, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1953, 27, 239-242 in K.W. KING, Endwise degradation of cellulose, in E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press, 1963, 159.
- (48) B. NORKRANS, Physiologia Plantarum, 1950, 2, 75-78

- (49) B. NORKRANS, *Physiologia Plantarum*, 1963, 16, 11-19.
- (50) NORMAN et BARTHOLONEW, *Soil. Sci. Proc. Soc.* 1940, 5, 243, in J.A. et M.M. GASCOIGNE, *Biological degradation of cellulose*, Butterworths, 1960, 45.
- (51) A.S PERLIN, The action of B-Glycanases on B-glycans of mixed linkage in
E.T. REESE, *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials*, Pergamon Press, 185-195.
- (52) J.C. PEW, *Tappi*, 1957, 40, 553-558.
- (53) J. POCHON et M. de BARJAC, *Traité de microbiologie des sols*, 3ème partie, Dunost, 1958.
- (54) PRINGSHEIM, *Hoppe-Seyl. Z.* 1912, 78, 266, in J.A. et M.M. GASCOIGNE, *Biological degradation of cellulose*, Butterworths, 1960, 39.
- (55) E.I. RABINOWITCH, *Photosynthesis*, Vol. 1, 599, p. Interscience, New York 1945, in
E.B. COWLING, *Structural features of cellulose that influence its susceptibility to enzymatic hydrolysis*, in
E.T. REESE, *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials*, Pergamon Press 1963, 2.
- (56) RACE, ROW et SPEAKMAN, *J. Soc. Dyers and col.* 1945, 61, 310 in J.A. et M.M. GASCOIGNE, *Biological degradation of cellulose*, Butterworths, 1960, 232.
- (57) RAMSEY, M. Sc. Thesis, University of Leeds, 1954, in J.A. et M.M. GASCOIGNE, *Biological degradation of cellulose*, Butterworths, 1960, 207.
- (58) E.T. REESE, *Appl. Microbiol.* 1956, 4, 39-45
- (59) E.T. REESE, *Ind. Engng. Chem.* 49, 89-93.
- (60) E.T. REESE, *Marine Boring and Fouling Organisms*, ed. by D.L. RAY, of Washington Press, 265-290, in
E.B. COWLING, *Structural features that influence its susceptibility to enzymatic hydrolysis*, in
E.T. REESE, *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials*, Pergamon Press, 1963, 18.
- (61) E.T. REESE et W. GILLIGAN, *Arch. Biochem. Biophys.* 1953, 45, 74-82.

- (62) E.T. REESE, L. SEGAL et V.W. TRIPP, Text. Res. J. 1957, 27, 626-632 in
E.B. COWLING, Structural features of cellulose that influence its susceptibility to enzymatic hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press, 1963, 21.
- (63) E.T. REESE et H.S. LEVINSON, Physiologia Plantarum, 1952, 5, 345-366.
- (64) E.T. REESE, R.G.H. SIU et H.S. LEVINSON, J. Bacteriol. 1950, 599, 485-497.
- (65) E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press, 1963, 93-114.
- (66) K.C. REID, Chem. and Ind. 1953, 144, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cellulose, Butterworths, 1960, 241.
- (67) J. RIVIERE, Ann. Agron. 1961, 12, (4), 399-424.
- (68) P.R. SAUNDERS, R.G.H. SIU et R.N. GENEST, J. Biol. Chem. 1948, 174, 697-703.
- (69) H. SCHMITZ et F. KAUFERT, Amer. J. Bot. 1936, 23, 635-638, in E.B. COWLING, Structural features of cellulose that influence its susceptibility to enzymatic hydrolysis, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press, 1963, 39.
- (70) K. SELBY, Biochem. J. 1961, 79, 562-566.
- (71) K. SELBY, C.C. HAITLAND et K.V.A. THOMPSON, in
K. SELBY, the effect of cellulolytic enzymes on some properties of cotton fibers, in
E.T. REESE, Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials, Pergamon Press, 1963, 39.
- (72) K. SELBY, Biochem. J. 1965, 94, 578.
- (73) SINCLA, Ann. Acad. Sci. Fennicae, 1931, A 34, 1, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation of cellulose, Butterworths, 1960, 47.
- (74) R.G.H. SIU, Microbial decomposition of cellulose, Reinhold New York, 1951.

- (75) B.A. STONE, Biochem. J. 1957, 66, 1.
- (76) THAYSEN, BUNKER, BUTLIN et WILLIAMS, Ann. Appl. Biol. 1939, 26, 750, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Pergamon Press, 1960, 232.
- (77) R. THOMAS, Austral. J. Biol. Sci. 1956, 2, 159-183.
- (78) R. THOMAS et D.R. WHITAKER, Nature, 1958, 181, 715-716.
- (79) N. TOYAMA, J. Fermentation Technol. 1952, 30, 89-93, in
C.A. 1953, 47, 5679 c.
- (80) N. TOYAMA, J. Fermentation Technol. 1952, 30, 409-414, in
C.A. 5679 e.
- (81) N. TOYAMA, J. Fermentation Technol. 1963, 31, 315-320,
in C.A. 1954, 48, 6114 h.
- (82) N. TOYAMA, J. Fermentation Technol. 1954, 32, 300-307,
in C.A. 1955, 49, 1866 a.
- (83) N. TOYAMA, J. Fermentation Technol. 1955, 33, 406-410, in
C.A. 1956, 50, 7390 d.
- (84) N. TOYAMA, J. Fermentation Technol. 1956, 34, 281-285,
in C.A. 1960, 54, 22751 a.
- (85) N. TOYAMA et Y. MATJUDA, J. Fermentation Technol. 1958,
36, 375-380, in C.A. 1959, 53, 20255 c.
- (86) N. TOYAMA, Bull. Faculty Agric. University of Miyazaki,
1858, No 4, 40-58, in C.A. 1959, 53, 22239 e.
- (87) N. TOYAMA, Bull. Faculty Agric. University of Miyazaki
1960, 54, 19842 g.
- (88) N. TOYAMA et T. SMIBATA, J. Fermentation Technol. 1961,
39, 262-268, in C.A. 1963, 58, 12825 e.
- (89) U.V. ARTIOVAARA, Acta Agral. Fennicae, 1935, 32, 107,
in C.A. 1936, 30, 11663.
- (90) WALKER et WARREN, Biochem. J. 1938, 32, 31, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths 1960, 45.
- (91) C.S. WALSETH, Tappi, 1952, 35, 228-232
- (92) C.S. WALSETH, Tappi, 1952, 35, 233-238.
- (93) D.R. WHITAKER, Canad. J. Bot. 1951, 29, 159.

- (94) D.R. WHITAKER, Nature, 1951, 168, 1070-1071
- (95) D.R. WHITAKER, Arch. Biochem. Biophys. 1953, 43, 253-268
- (96) D.R. WHITAKER, Arch. Biochem. Biophys. 1954, 53, 439-449
- (97) D.R. WHITAKER, Arch. Biochem. Biophys. 1954, 53, 436-438
- (98) D.R. WHITAKER, Canad. J. Biochem. Physiol. 1956, 34,
102-115.
- (99) WINOGRADSKY, Ann. Inst. Pasteur, 1929, 43, 549
- (100) WOODMAN et STEWART, J. agric. Sci. 1928, 18, 713, in
J.A. et M.M. GASCOIGNE, Biological degradation
of cellulose, Butterworths, 1960, 47.

TABLE DES MATIERES

	Pages
But de notre travail	1
Introduction	3

CHAPITRE I

METHODES D'EVALUATION DE LA CROISSANCE
DU MYCELIUM SUR CELLULOSE SOLKA FLOC ET
SUR RAFLES DE MAIS, DE L'ATTAQUE DU SUBS-
TRAT CELLULOSIQUE ET DE L'ACTIVITE CEL-
LULOLYTIQUE DES FILTRATS DE CULTURE.

Introduction	14
Méthodes d'évaluation de la croissance du mycelium et de l'attaque du substrat cellu- losique	17
Evaluation de l'activité cellulolytique des filtrats de culture	27
Facteurs constants choisis pour la réalisa- tion des cultures	39

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'AGITATION ET DE L'AERATION
SUR LA PRODUCTION DE MYCELIUM ET DES
CELLULASES.

Introduction	40
Aération forcée et agitation	41
Influence du rapport entre le volume de l'erlen de culture et le volume de culture.	44
Conclusion	45

CHAPITRE III

INFLUENCE DU SUBSTRAT DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE MYCELIUM ET DES CELLULASES

Comparaison entre deux cultures effectuées sur cellulose solubilisée et sur cellulose insoluble	47
Influence de la dimension des particules du substrat cellulosique (rafles de maïs).	52
Influence de la concentration du substrat cellulosique	56

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA PRÉCULTURE SUR LA PRODUCTION DE MYCELIUM, LA DÉGRADATION DU SUBSTRAT ET LA PRODUCTION DE CELLULASES

Influence de la nature du substrat de la préculture	68
Influence du volume d'ensemencement de la culture	70
Influence de l'âge de la préculture	72

CHAPITRE V

INFLUENCE DES IONS MINÉRAUX ET DU pH SUR LA PRODUCTION DU MYCELIUM ET DES CELLULASES ET SUR LA DÉGRADATION DU SUBSTRAT.

Introduction.	78
Mesures cinétiques de la croissance du mycelium, de la production des cellulases et de la dégradation du substrat et relations avec la consommation des ions et l'évolution du pH au cours de la culture.	79
Conclusions.	95

CHAPITRE VI

MODIFICATIONS APPORTEES A LA COMPOSITION IONIQUE ET AU pH DU MILIEU DE CULTURE ET INFLUENCE SUR LA CROISSANCE DU MYCELIUM ET SUR LA PRODUCTION DE CELLULASE.

Modifications de la composition ionique et du pH du milieu avant la réalisation de la culture	98
Modifications de la composition ionique et du pH au cours de la culture	105
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	128
Index bibliographique	131

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

RELATIONS ENTRE LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES
MOLECULES ORGANIQUES ET LEUR ACTIVITE PHARMACODYNAMIQUE

Vu :

Les Membres du Jury :

M. J. CHOPIN

Président

Melle D. GAUTHERON)

M.M. H. PACHECO (Examineurs

F. STOEBER)

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 13 Juillet 1966

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université

P. LOUIS

